



**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH**

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

Monitorització de la decantació de la biomassa d'un bioreactor mitjançant mesures d'impedància elèctrica

Treball final de grau

Enginyeria de Sistemes Biològics

Autor: Núria Mata Calabuig

Tutors: Ernesto Serrano i

Teresa Balanyà

10 de juliol de 2018

Abstract

The characterization of biological materials through their electrical properties has been developed for decades in different sectors such as medicine, food industry and biotechnology. The aim of this work was to study the possibility of implementing the technique of electrical impedance spectroscopy (EIS) in the field of water and waste treatment. The interest on this technique is that it is not invasive and, in the future, it would be simple to implement.

This work has been a continuation of the final degree work of Olivia Cantons (2016), where a simpler interpretation than the β dispersion was suggested. Therefore, the relationship between the EIS and the biomass concentration has been studied, through the slope of the impedance depending on the frequency. The interest in studying the slope, instead of studying the region of the dispersion β , would be the simplification of the technique.

To carry out this study, different measurements were performed with an impedance analyser (Agilent 4294) in commercial yeast samples and active sewage sludge, with the main objective of detecting changes in the impedance in changing the biomass concentration and also detecting changes during sedimentation.

The results obtained have determined, as already suggested Cantons, that a simpler reading of the bioimpedance through the slope is possible, without having to study the region of the dispersion β . A relationship between the slope of the impedance, as well as the capacity obtained of the data adjustment, with the SSV (which is the unit of concentration of biomass usual in water treatment plants) has been obtained.

Keywords: bioreactor, electrical impedance, waste water

Resum

La caracterització dels materials biològics mitjançant les seves propietats elèctriques s'ha desenvolupat durant dècades en diferents sectors com la medicina, la indústria alimentària i la biotecnologia. En aquest treball s'ha estudiat la possibilitat d'implementar la tècnica d'espectroscòpia d'impedància elèctrica (EIE) en el camp del tractament d'aigües i residus. L'interès en aquesta tècnica radica que no és invasiva i en un futur seria senzilla d'implementar.

Aquest treball ha estat una continuació del treball final de grau d'Olivia Cantons (2016), on es suggeria una interpretació més simple que la de la dispersió β . Per tant, aquest treball ha estat enfocat en estudiar la relació entre l'EIE i la concentració de biomassa, a través del pendent de la impedància respecte la freqüència. L'interès en estudiar el pendent, en lloc d'estudiar la regió de la dispersió β , seria la simplificació de la tècnica.

Per realitzar aquest estudi, s'han realitzat diferents mesures amb un analitzador d'impedància (Agilent 4294) en mostres de llevat comercial i fangs actius de depuradora, amb el principal objectiu de detectar canvis en la impedància en canviar la concentració de biomassa i la seva sedimentació.

Els resultats obtinguts han determinat, com ja va suggerir Cantons, que una lectura més simple de la bioimpedància a través del pendent és possible, sense haver d'estudiar la regió de la dispersió β . S'ha obtingut que hi ha una relació entre el pendent de la impedància, com també de la capacitat obtinguda amb l'ajustament de dades, amb els SSV (Sòlids Suspesos volàtils), la qual és la unitat de concentració de biomassa habitual en plantes de tractament d'aigües.

Paraules clau: bioreactor, impedància elèctrica, aigües residuals

Resumen

La caracterización de los materiales biológicos mediante sus propiedades eléctricas se ha desarrollado durante décadas en diferentes sectores como la medicina, la industria alimentaria y la biotecnología. En este trabajo se ha estudiado la posibilidad de implementar la técnica de espectroscopia de impedancia eléctrica (EIE) en el campo del tratamiento de aguas y residuos. El interés en esta técnica radica en que no es invasiva y en un futuro sería sencilla de implementar.

Este trabajo ha sido una continuación del trabajo final de grado de Olivia Cantons (2016), donde se sugería una interpretación más simple que el de la dispersión β . Por lo tanto, este trabajo ha estado enfocado en el estudio de la relación entre la EIE y la concentración de biomasa, a través de la pendiente de la impedancia respecto la frecuencia. El interés en estudiar la pendiente, en lugar de estudiar la región de la dispersión β , sería la simplificación de la técnica.

Para realizar este estudio, se han realizado diferentes medidas con un analizador de impedancia (Agilent 4294) en muestras de levadura comercial y fangos activos de depuradora, con el principal objetivo de detectar cambios en la impedancia en cambiar la concentración de biomasa y también de detectar cambios durante la sedimentación.

Los resultados obtenidos han determinado, como ya sugirió Cantons, que una lectura más simple de la bioimpedancia a través de la pendiente es posible, sin tener que estudiar la región de la dispersión β . Se ha obtenido que hay una relación entre la pendiente de la impedancia, así como de la capacidad obtenida mediante el ajuste de datos, con los SSV (Sólidos Suspendidos Volátiles), la cual es la unidad de concentración de biomasa habitual en plantas de tratamiento de aguas.

Palabras clave: biorreactor, impedancia eléctrica, aguas residuales

Agraïments

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies al meu tutor Ernesto Serrano per tota l'ajuda, la paciència i els coneixements que m'ha brindat durant la realització d'aquest projecte. Agrair també l'ajuda a la meva tutora Teresa Balanyà per ajudar a desenvolupar-me en les tasques de laboratori en tot el procés d'anàlisis químiques i per facilitar-me totes les mostres.

També vull agrair tot el suport dels meus companys de carrera, en especial a la Mònica i al Miquel, per tots els moments compartits.

A la meva família, per la seva estima i paciència inigualable. I per últim, a l'Alejandro per ser el meu recolzament i encoratjament en tot moment.

Índex

Índex de figures	8
Índex de taules	10
1. Introducció	11
1.1. Projecte OPRENAC	11
1.2. Conceptes bàsics	11
1.2.1. AnSBR	11
1.2.2. La impedància elèctrica	12
1.2.3. Mesura de la conductivitat elèctrica: espectroscòpia	13
1.2.4. Tècniques de mesura	17
1.3. Estat de l'art	18
2. Objectius	20
3. Materials i mètodes	21
3.1. Mostres	21
3.1.1. Llevat	21
3.1.2. Fangs actius	21
3.2. Instrumentació per l'estudi de l'EIE	23
3.3. Mètode de mesura del pendent	25
3.4. Interferències en la mesura d'impedància	26
3.5. Mètodes analítics	28
3.5.1. Temperatura i CE	29
3.5.2. SST i SSV	29
3.5.3. Ajustament de les dades d'EIE al model circuital	30
4. Resultats i discussió	33
4.1. Mostra de llevat amb aigua destil·lada	33
4.2. Mostra de llevat amb aigua de l'aixeta	35
4.3. Mostra fangs activats 19 de març	37
4.3.1. Mostra 1	39
4.3.2. Mostra 2	41

4.3.3. Mostra 4	43
4.4. Mostra fangs activats 25 d'abril	44
4.4.1. Mesures amb el pot V	45
4.4.2. Mesures amb el pot N	52
4.5. Mostra fangs activats 23 de maig	53
4.5.1. Mostra 1	54
4.5.2. Mostra 2	56
4.5.3. Mostra 3	58
4.6. Discussió	59
5. Conclusions	60
Bibliografia	61
Annex	63

Índex de figures

Figura 1: Passos del cicle d'un SBR [2]	11
Figura 2: Esquema d'una cel·la de conductivitat [6]	13
Figura 3: Model elèctric cel·la de conductivitat	14
Figura 4: Model circuital simplificat d'una solució amb suspensió cel·lular	14
Figura 5: Representació simplificada dels corrents d'alta i baixa freqüència a través d'una suspensió cel·lular [7]	15
Figura 6: Magnitud de la impedància mesurada respecte de la freqüència	16
Figura 7: Circuit de la mesura bipolar	17
Figura 8: Circuit de la mesura tetrapolar	17
Figura 9: Motra de llevat connectada a l'analitzador d'impedància	21
Figura 10: Esquema del procés de la EDAR de Sant Feliu de Llobregat [28]	22
Figura 11: Imatges del microscopi (Epistylis plicatilis, nemàtode i Litonotus fasciola)	22
Figura 12: Analitzador d'impedància Agilent 4294A amb les marques de la posició de la mesura	23
Figura 13: Configuració dels elèctrodes on: a) Elèctrodes adjacents; b) Elèctrode oposat	24
Figura 14: Captura de pantalla del programa de LabVIEW® amb els paràmetres usats	24
Figura 15: Gràfic on es mostra la zona "plana" de la qual volem saber pendent.	25
Figura 16: Gràfic impedància respecte freqüència	26
Figura 17: Posició del recipient de mesura respecte l'analitzador	27
Figura 18: Les dues configuracions de recipients on: a) Pot V; b) Pot N	27
Figura 19: Model circuit simplificat i en detall de la impedància dels elèctrodes	28
Figura 20: Gràfic mòdul de la impedància respecte de la freqüència	31
Figura 21: Gràfic fase de la impedància respecte de la freqüència	31
Figura 22: Gràfic de Nyquist. La fletxa vermella indica l'efecte d'un pic de ressonància	32
Figura 23: Gràfic de la evolució del pendent amb l'addició de llevat	34
Figura 24: Gràfic de la evolució del pendent respecte la capacitat	34
Figura 25: Gràfic evolució del pendent respecte l'addició de llevat	36
Figura 26: Gràfic evolució pendent respecte capacitat	36
Figura 27: Gràfic de l'evolució del pendent, amb la seva desviació estàndard, i SSV de les mostres	38
Figura 28: Gràfic de la relació entre el pendent, amb la seva desviació estàndard, i la capacitat de les mostres	38
Figura 29: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 1. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2	39
Figura 30: Evolució pendent respecte l'estat de la mostra 1	39
Figura 31: Evolució pendent respecte la capacitat en cada estat de la mostra 1	40
Figura 32: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 2. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2; d) Sedimentació 3	41

Figura 33: Evolució pendent respecte estat de la mostra 2	41
Figura 34: Evolució pendent respecte la capacitat de la mostra 2	42
Figura 35: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 4. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2	43
Figura 36: Evolució del pendent respecte la sedimentació de la mostra 4	43
Figura 37: Evolució del pendent respecte la capacitat de la mostra 4	44
Figura 38: Configuració del pot V	44
Figura 39: Configuració del pot N	45
Figura 40: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte SSV de les mostres	46
Figura 41: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat de les mostres	46
Figura 42: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 1. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2	47
Figura 43: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, i estat de la mostra 1	47
Figura 44: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte la capacitat de la mostra 1	48
Figura 45: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 2. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2	49
Figura 46: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, i l'estat de la mostra 2	49
Figura 47: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, i la capacitat de la mostra 2	50
Figura 48: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 3. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2	50
Figura 49: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte sedimentació mostra 3	51
Figura 50: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat mostra 3	51
Figura 51: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, i el SSV de les mostres	52
Figura 52: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat mostres	52
Figura 53: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte SSV mostres	53
Figura 54: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat mostres	54
Figura 55: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 1. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2; d) Sedimentació 3	54
Figura 56: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte estat de la mostra 1	55
Figura 57: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat mostra 1	55
Figura 58: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 2. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2	56
Figura 59: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte l'estat de la mostra 2	56
Figura 60: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat mostra 2	57
Figura 61: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 3. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2	58
Figura 62: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte l'estat de la mostra 3	58
Figura 63: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat mostra 3	59

Índex de taules

<i>Taula 1: Valors de temperatura i conductivitat per cada concentració de llevat comercial</i>	33
<i>Taula 2: Valors dels elements circuital i del pendent de la mostra de llevat</i>	33
<i>Taula 3: Valors de temperatura i conductivitat de la mostra de llevat</i>	35
<i>Taula 4: Valors dels elements circuital i del pendent de la mostra de llevat</i>	35
<i>Taula 5: Valors dels elements circuital i pendent de les mostres</i>	37
<i>Taula 6: Valors model circuital i pendent de la mostra 1</i>	39
<i>Taula 7: Valors model circuital i pendent, de la mostra 2</i>	41
<i>Taula 8: Valors model circuital i pendent, de la mostra 4</i>	43
<i>Taula 9: Valors dels elements circuital i del pendent de la mostra</i>	45
<i>Taula 10: : Valors model circuital i pendent, de la mostra 1</i>	47
<i>Taula 11: Valors model circuital i pendent, de la mostra 2</i>	49
<i>Taula 12: : Valors model circuital i pendent, de la mostra 3</i>	50
<i>Taula 13: : Valors model circuital i pendent, en configuració d'elèctrodes adjacents</i>	52
<i>Taula 14: Valors model circuital i pendent, en configuració d'elèctrodes adjacents</i>	53
<i>Taula 15: Valors model circuital i pendent</i>	54

1. Introducció

1.1. Projecte OPRENAC

Aquest treball de fi de grau ha sorgit del projecte “Tecnologías avanzadas para OPTimizar la Recuperación de Energía y Nutrientes en aguas residuales de Alta Carga del sector agroalimentario” (OPRENAC), el qual té com objectiu el desenvolupament de noves tecnologies per optimitzar la recuperació de nutrients i d’energia en el tractament d’aigües residuals d’alta càrrega orgànica, com per exemple purins de porc, del sector agroalimentari.

En concret, aquest treball pertany al *subprojecte 2.2*, el qual té com a objectiu principal l’estudi de la aplicació de reactors anaeròbics discontinus seqüencials (AnSBR) com a sistema per a tractar efluent líquids d’alta càrrega orgànica. Amb un objectiu concret que seria el de desenvolupar un sistema d’obtenció de densitat i distribució de la biomassa activa d’un reactor AnSBR mitjançant la mesura de la seva impedància elèctrica, que denominarem bioimpedància a partir d’ara, i desenvolupar un prototip de sistema de control basat en aquesta mesura [1].

1.2. Conceptes bàsics

1.2.1. AnSBR

Els bioreactors AnSBR, del anglès Anaerobic Sequential Batch Reactor, consisteixen en el tractament biològic de fangs activats en sistemes discontinus, és a dir, consisteixen en un funcionament basat en una seqüència de tractament, cicle, que es repeteix al llarg del temps. Aquest sistema permet eliminar nutrients com el nitrogen i el fòsfor, així com disminuir la DQO. Cada cicle compren una sèrie d’etapes que es repeteixen al llarg del temps, en general aquestes etapes són: ompliment, reacció (N-DN-N), sedimentació, buidat i tornar a començar el cicle [2]:

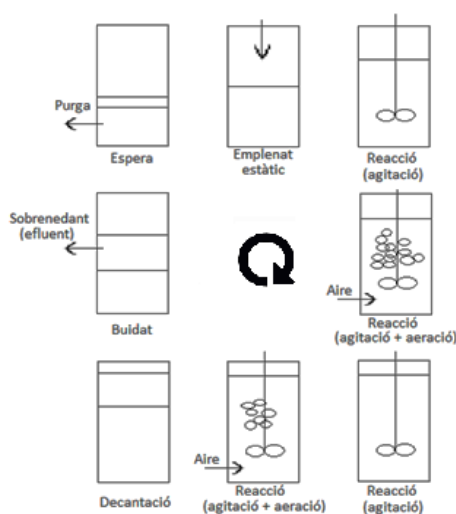


Figura 1: Passos del cicle d'un SBR [2]

L'avantatge que té aquest tipus de bioreactors envers d'altres és el baix temps de retenció hidràulica i l'alt temps de retenció cel·lular i de sòlids. La optimització d'aquest tipus de bioreactor requereix un mecanisme de control automàtic, el qual permeti adaptar els paràmetres d'operació, així com poder controlar l'estat i la qualitat dels microorganismes de l'efluent a tractar. Aquest tipus de reactor és molt eficaç per a l'eliminació biològica de nitrogen en la fracció líquida de purins de porc.

El mecanisme de control, objectiu d'aquest projecte, al qual pertany aquest treball, estaria funcionant durant l'etapa de decantació-buidat, on ens permetria conèixer el moment òptim en el qual ja es podria retirar el sobrenedant. És requereix un sistema de control ja que la sedimentació variarà segons el pH, l'acumulació d'àcids, l'amoni, etc, i per tant necessitem un mecanisme que ens asseguri quan podem passar a l'etapa de buidat del reactor. Tot i que en aquest treball no hem arribat a fer proves amb aquest tipus de reactor, en un futur, se'n faran per a obtenir aquest prototip de control que és l'objectiu final del projecte.

1.2.2. La impedància elèctrica

La resistència elèctrica (R) és una propietat extensiva de la matèria, que depèn directament de la resistivitat elèctrica (ρ), que és una propietat intrínseca. Per tant, la mesura d' R es fa servir per obtenir característiques físiques de diversos materials. Per exemple, si considerem un objecte cilíndric amb resistivitat elèctrica ρ , longitud L i secció A , la seva R serà:

$$R = \rho \cdot \frac{L}{A} \quad (1)$$

A l'equació 1, veiem que actuen dos factors: la ρ i una constant geomètrica (L/A) o també anomenada constant de cel·la (K), també anomenat constant de cel·la (K). Moltes vegades, diversos canvis físics o químics produeixen canvis en el material que es veuen reflectits en la seva resistivitat (ρ). Des d'un punt de vista experimental, el principi de mesura es basa en la llei d'Ohm, on podem aplicar una diferència de potencial V al material i, simultàniament, mesurar la resposta de corrent, I :

$$R = \frac{V}{I} \quad (2)$$

A l'equació 2, parlem d'una resistència que s'obté quan tant el corrent com tensió són continus. Els teixits biològics tenen components resistius, però també estan compostats per components capacitius, dels quals no podríem observar l'efecte amb corrent continu, però sí amb corrents sinusoidals. Com veurem més endavant, és important veure l'efecte dels components capacitius ja que la membrana es comporta com una capacitat. Quan fem servir tensions i corrents

sinusoïdals s'ha de parlar d'impedància elèctrica (Z), que serà funció de la freqüència. La freqüència altera la manera en que percebem la impedància del material que estem mesurant i les característiques elèctriques del material mostren una dependència a la freqüència del senyal sinusoïdal [3]. Per tant, per veure canvis en el material biològic, a través de les seves característiques elèctriques, serà necessari emprar corrents sinusoïdals. Aquestes tensions i corrents són prou petites com per que es consideri un mètode no invasiu, i que en un futur, serà senzill d'implementar. D'aquí l'interès en desenvolupar-la com a mètode de mesura i caracterització de materials [4], [5].

1.2.3. Mesura de la conductivitat elèctrica: espectroscòpia

Per a mesurar la impedància, s'ha emprat la cel·la de mesura de conductivitat elèctrica de dos elèctrodes de solució salina. La Figura 1 [6], es mostra una simplificació d'aquesta cel·la. Però, juntament a la conductivitat elèctrica del medi hi apareixen altres fenòmens físics que es sumaran a la impedància que mesurem. Per exemple, la impedància de polarització dels elèctrodes. Als elèctrodes es formarà una doble capa de càrregues elèctriques degut al camp elèctric establert quan imposem una certa diferència de potencial entre els elèctrodes. Aquesta doble capa es pot entendre com un condensador connectat en sèrie amb la font d'excitació (la que imposa la diferència de potencial entre els elèctrodes), però a més a més, succeeixen reaccions redox que permeten l'intercanvi ió-electró i això significa que existeix un cert corrent degut al moviment de càrregues. Una manera de representar l'efecte d'aquests corrents és mitjançant una resistència en paral·lel al condensador esmentat anteriorment. Per tant, entenem el comportament dels elèctrodes com una capacitat C_p i una resistència R_p (seguint la nomenclatura estàndard) connectats en paral·lel, els quals representarem com Z_e . Com veurem més endavant, aquesta impedància dels elèctrodes no ens afectaran degut al rang de freqüències en el qual treballarem.

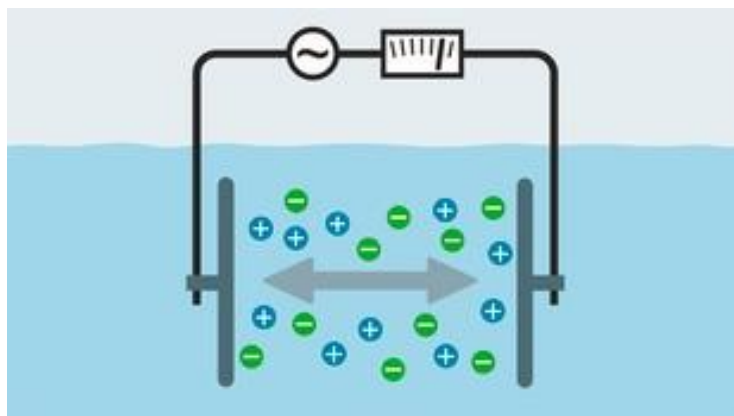


Figura 2: Esquema d'una cel·la de conductivitat [6]

El comportament elèctric d'aquesta cel·la de conductivitat podem modelar-lo amb el circuit elèctric de la Figura 2, on tindríem que les impedàncies dels elèctrodes (Z_e) i la resistència de la solució (R_s) que volem mesurar queden connectats en sèrie:

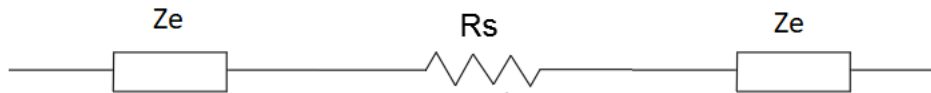


Figura 3: Model elèctric cel·la de conductivitat

En aquest model equivalent, la conductivitat es pot calcular segons:

$$\sigma_s = \frac{K}{R_s} \quad (3)$$

on K és l'anomenada constant de cel·la que està determinada per la geometria dels elèctrodes. En aquest treball, i com s'ha comentat anteriorment, i per la geometria de Z_e serà negligible en les nostres mesures.

Quan enlloc de tenir una solució inert, el que mesurem és una solució que conté una suspensió de cèl·lules no podem representar-la simplement com una resistència R_s com en el circuit de la Figura 2, sinó que ara passarà a ser una impedància Z_b com es mostra a la Figura 3. Bàsicament, la suspensió de cèl·lules es compon d'un medi extracel·lular representat per la resistència R_e , i un medi intracel·lular R_i el qual queda aïllat per la membrana de les cèl·lules, representada per una capacitat C_m , deguda a la doble membrana lipídica que les envolta i que actua com una capa dielèctrica (aïllant elèctric):

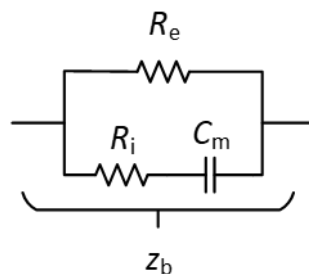


Figura 4: Model circuital simplificat d'una solució amb suspensió cel·lular

Quan fem passar un corrent sinusoidal a través d'una solució cel·lular, aquest corrent afecta de diferent manera segons la freqüència de la mesura. Quan apliquem corrents de baixa freqüència ens trobem que la capacitat, la qual té una reactància que depèn de la freqüència, fa que la membrana tingui una impedància molt alta i fa que el corrent circuli per R_e . Obtenint l'anomenada zona plana, on domina un component resistiu, que serà el medi extracel·lular. Al augmentar la freqüència, el corrent passarà pel medi intracel·lular, i tindrem corrents que van tant pel medi extracel·lular com pel intracel·lular. De manera que obtindrem camins diferents pels corrents a altes (HF) o baixes (LF) freqüències [7], els quals podem veure a la Figura 5:

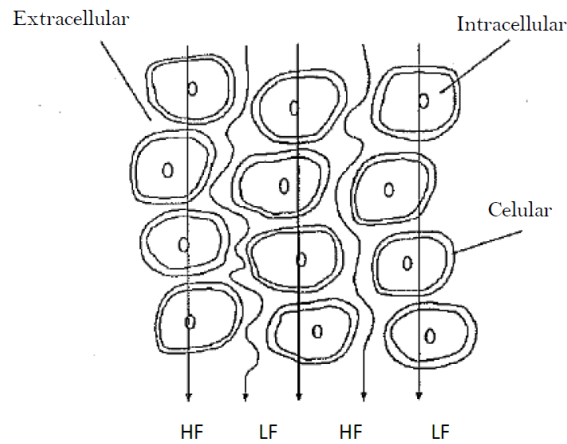


Figura 5: Representació simplificada dels corrents d'alta i baixa freqüència a través d'una suspensió cel·lular [7]

L'equació 4 ens descriu la impedància mesurada en funció de la freqüència i dels paràmetres circuitalmentals:

$$Z(jf) = 2Z_e + Z_b = \frac{2R_p}{1 + \frac{jf}{f_p}} + \frac{R_e \left(1 + \frac{jf}{f_i}\right)}{1 + \frac{jf}{f_{ie}}} \quad (4)$$

on:

$$f_p = \frac{1}{2\pi R_p C_p} \quad (5)$$

$$f_i = \frac{1}{2\pi R_i C_m} \quad (6)$$

$$f_{ie} = \frac{1}{2\pi (R_i + R_e) C_m} \quad (7)$$

L'espectre esperat del mòdul de Z mesurat en funció de la freqüència serà el següent:

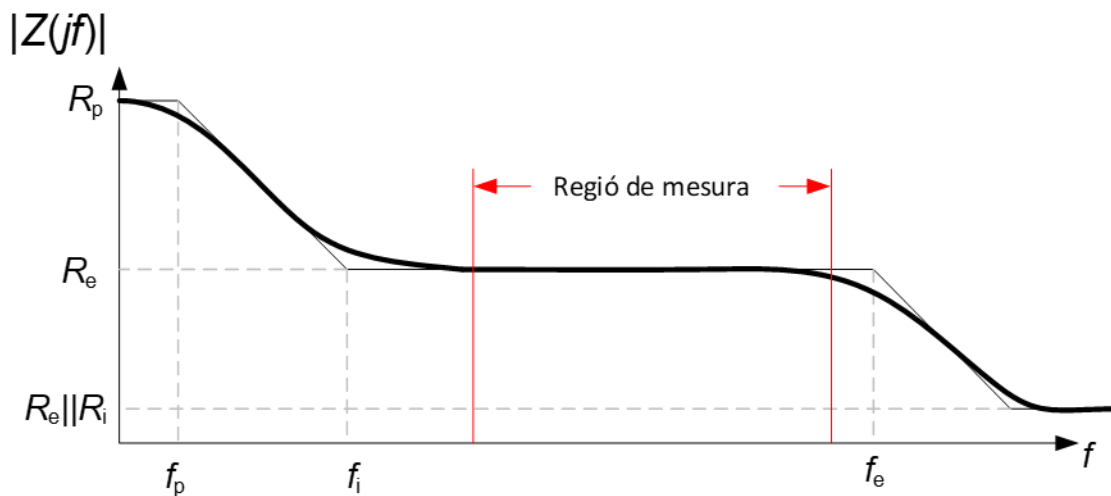


Figura 6: Magnitud de la impedància mesurada respecte de la freqüència

Com podem veure, a baixes freqüències, degut al fenomen de polarització dels elèctrodes (C_p) hi ha una caiguda de la magnitud de la impedància. Per tal que la impedància dels elèctrodes no ens afecti, treballem en un rang per sobre de 100 kHz, ja que com [8] va observar, a partir d'aquesta freqüència ja no afecta el fenomen de polarització, i no comporta una interferència en la nostra mesura.

A altes freqüències es produeix una segona caiguda de la magnitud de la impedància, la qual anomenarem "genoll", degut al comportament del teixit biològic, i és que la membrana cel·lular actua com una capacitat (C_m). Segons la quantitat de cèl·lules que tindrem, C_m tindrà un valor diferent, i per tant aquest "genoll" canviarà de posició, que farà canviar el pendent de la zona plana, que és el que volem estudiar. Les línies vermelles mostren la regió de freqüències en les quals treballarem.

Els mètodes convencionals de mesura de biomassa estudien la dispersió β que és la regió de l'anomenat "genoll", i es deu al comportament biològic de la membrana cel·lular (C_m). Llavors, la localització de la dispersió β dependrà de la quantitat de biomassa que es troba a la solució, ja que com més concentració de biomassa, la capacitat de la membrana serà superior i per tant, la dispersió β es trobarà a freqüències més baixes.

Es pot donar que en una solució sense cap contingut biològic també es pugui veure aquest “genoll”. Però, en aquest cas, el comportament es deurà a una capacitat elèctrica paràsita deguda al cablejat dels elèctrodes.

1.2.4. Tècniques de mesura

Com s’ha explicat anteriorment, la tècnica de mesura d’impedància es basa en aplicar la llei d’Ohm, és a dir, injectar un corrent i mesurar la resposta de tensió, o a l’inrevés imposar una diferència de potencial i mesurar el corrent. Segons la quantitat d’elèctrodes que siguin emprats en la mesura, podem dir que hi ha dos tipus de mesura:

- Mesura bipolar: aquesta mesura es basa en dos punts de contacte, elèctrodes, amb la mostra. De manera que, com podem veure a l’equació 8, la impedància mesurada Z_M inclourà la dels elèctrodes, Z_e . La seva influència es pot reduir depenent de la freqüència de mesura. La mesura bipolar és el cas típic de les cel·les de conductivitat.

$$Z_M = 2Z_e + Z_x \quad (8)$$

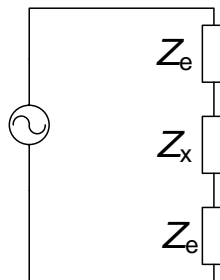


Figura 7: Circuit de la mesura bipolar

- Mesura tetrapolar: en aquest mètode es fan servir quatre punts de contacte amb la mostra. En aquest sistema, no hi ha cap influència dels elèctrodes. És un sistema de mesura més complex i més car. La mesura tetrapolar és típica dels conductímetres de gama alta.

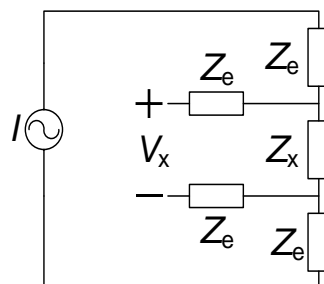


Figura 8: Circuit de la mesura tetrapolar

Degut a la seva senzillesa, hem emprat la configuració de mesura bipolar, en el qual, com ja hem mencionat anteriorment, tindrem una influència molt petita de la impedància dels elèctrodes.

La caracterització completa d'una certa impedància o mostra de material passa per obtenir el valor de dita impedància en tot un rang de freqüència. A aquesta tècnica se l'anomena espectroscòpia d'impedància elèctrica (EIE) i habitualment es realitza mitjançant instruments especialitzats, com ara un analitzador d'impedància. Aquest instrument realitza un escombrat d'un cert nombre de freqüències, és a dir, mesura la impedància elèctrica complexa per a cada freqüència dins d'un rang. Un cop obtingut l'espectre de la impedància elèctrica, es sol fer un ajustament de les dades a un model elèctric. Si es tracta d'una mostra biològica, el model habitual és el de la Figura 4.

1.3. Estat de l'art

Els primers estudis publicats relacionats amb la mesura de la impedància en el camp de la biologia, els situem durant la última dècada del segle XIX, on George N. Stewart va realitzar un estudi del teixit cardíac introduint elements com la conductància i la conductivitat [9], [10].

Als anys 20, H. Fricke va escriure nombrosos articles sobre la capacitat elèctrica en l'àmbit de la medicina [11]. Als anys 50, Herman P. Schwan i Hermann Pauly publicaren articles sobre les propietats elèctriques dels teixits i les cèl·lules en suspensió [12], [13].

Però no va ser fins la dècada dels 70 on va començar a créixer el nombre de publicacions en aquest camp, enfocant-se en l'ús de la impedància com a eina de control de qualitat en la indústria alimentària [14]–[19], i per identificar grups de microorganismes com bacils coliformes en carn [20], Salmonella [21], i antibiòtics [22].

L'espectroscòpia és més interessant que altres tècniques ja usades pel control del procés de tractament de fangs ja que es pot modelar mitjançant mesures elèctriques les quals no són invasives [23]–[24].

Hi ha hagut un ràpid desenvolupament de la tècnica de mesura de la impedància, els analitzadors de cèl·lules comercials s'han llançat recentment per a la investigació en ciències de la vida i el desenvolupament farmacèutic [25]. Per bioreactors a gran escala, la sonda comercialitzada de Aber Biomass Probe, que utilitza espectroscòpia d'impedància, és la principal sonda de monitorització de viabilitat cel·lular en fermentadors i bioreactors [26].

Els documents publicats en aquest àmbit, han augmentat d'un grapat per any en el 1980, a unes poques desenes al 1990, a diversos centenars per any actualment. Això és degut a que és una

tècnica prometedora per quantificar les respostes cel·lulars durant el cultiu dels sistemes microfluídics, sent el nombre de cèl·lules i la seva viabilitat les característiques més importants a controlar, no-invasivament, i la seva possible monitorització [25], [26]. També s'ha demostrat l'ús del principi similar per a la detecció de diverses substàncies biològiques com enzims, anticossos i antígens, ADN i cèl·lules [25]. La seva superioritat sobre altres tècniques de laboratori rau en que utilitza una petita senyal, generalment en el mode de tensió, minimitzant així les alteracions de les propietats del mitjà, és a dir, l'estimulació aplicada no modifica les condicions d'equilibri del sistema [5]. El monitoratge de la biomassa mitjançant espectroscòpia elèctrica ofereix un gran potencial per a processos de desenvolupament, optimització i control. Tanmateix, requereix rutines de calibratge precises i robustes que es converteix en el taló d'Aquil·les de la tècnica [27].

2. Objectius

Aquest treball és una continuació al treball final de grau d'Olivia Cantons [8], la qual va començar a estudiar la possible aplicació de la bioimpedància elèctrica per a monitoritzar aigües residuals d'alta càrrega orgànica. Es va fer un primer estudi de l'evolució de la magnitud d'aquesta bioimpedància en un rang de freqüències, en concret es va estudiar el seu pendent en un rang de freqüències proper a la dispersió β (per sota dels 10 MHz) [8]. Els resultats van suggerir que aquest pendent té una relació amb la concentració de biomassa.

Un primer objectiu d'aquest treball és validar que la mesura del pendent de la magnitud de la bioimpedància elèctrica d'una mostra d'aigües residuals pot esdevenir una mesura indirecta de la seva concentració de biomassa. La idea és estudiar el comportament d'aquesta bioimpedància a la zona propera a la dispersió β , on l'absència de biomassa, com veurem més endavant, hauria de resultar un espectre pla (pendent proper a zero) en un determinat rang de freqüències que definirem. Partim de la hipòtesi de que els canvis de concentració de biomassa provoquen canvis en la dispersió β que a la vegada generen canvis en el pendent, per un mateix rang de freqüències. Si verifiquem aquesta relació de la concentració amb el pendent evitariem fer mesures de tot l'espectre i passariem a mesurar la magnitud en dues freqüències predeterminades, reduint la instrumentació necessària per fer les mesures.

Actualment, els AnSBR no disposen de mètodes automàtics per determinar el moment exacte en que l'inòcul (microorganismes) ha sedimentat. La pràctica habitual és la de deixar passar un cert temps on els microorganismes han sedimentat i han perdut la seva activitat. Això comporta que el procés de producció de biogàs del AnSBR no sigui tot l'efectiu que podria ser, ja que es podria tardar més temps del desitjable en introduir un inòcul actiu. Per tant, l'objectiu final d'aquest treball és el de permetre avançar en la mesura de la impedància en aigües residuals d'alta càrrega per a, en un futur, poder crear un aparell que mesuri l'estat de sedimentació de la biomassa en un AnSBR i que permeti la seva automatització i optimització del temps entre les seves etapes.

Si validéssim aquesta relació entre el pendent i la concentració de biomassa es simplificaria la caracterització de suspensions cel·lular, reduït la complexitat de l'instrument de mesura necessari (i per tant, el seu cost) i de la simplificació de l'anàlisi de dades. Per tant, en aquest treball s'ha volgut validar la relació del pendent de la impedància respecte la biomassa, tant en suspensions homogènies com també, per validar si és possible apreciar canvis en el pendent mentre la suspensió cel·lular sedimenta.

3. Materials i mètodes

Aquest projecte s'ha dut a terme a dos llocs en paral·lel: a l'EETAC (Escola d'Enginyeria de Telecomunicació i Aeroespacial de Castelldefels) i a l'ESAB (Escola Superior d'Agricultura de Barcelona). A l'EETAC s'han realitzat les mesures de bioimpedància mentre que a l'ESAB les anàlisis d'aquestes mostres.

3.1. Mostres

Aquest treball ha tingut dues etapes, a la primera s'ha treballat amb un cultiu de llevat comercial d'ús alimentari (Levital, Panibérica de Levadura S.A.) amb el qual l'objectiu ha sigut obtenir resultats de cultius "purs" (un sol tipus de microorganismes), a la vegada de poder controlar la seva concentració (al fer addicions) i la salinitat del medi. La segona etapa s'ha treballat amb fangs actius provinents d'una Estació Depuradora d'Aigües Residuals (EDAR).

3.1.1. Llevat

Per a les mesures de llevat, s'han realitzat proves en les quals a partir d'una mostra d'aigua sense llevat, s'hi afegia 1 g de llevat per litre d'aigua, seqüencialment després de cada lectura, fins a arribar a una concentració de 10 g/l. Amb aquestes mesures, el que es pretenia era comprovar si hi ha una relació entre la quantitat de llevat afegit i la resposta de la impedància. Els resultats obtinguts els trobem al capítol *Resultats i discussió*.



Figura 9: Motra de llevat connectada a l'analitzador d'impedància

3.1.2. Fangs actius

La segona etapa es va dur a terme amb fangs actius i aigua clarificada obtinguts de l'EDAR de Sant Feliu de Llobregat. Aquesta EDAR té un cabal de 72.000 m³ d'aigua residual/dia i una

capacitat de tractament de 320.000 habitants equivalents [28]. Els fangs activats de les mostres que hem obtingut provenien del reactor o de la recirculació del reactor biològic. A la figura 10 podem veure el tractament que es du a terme en aquesta planta, i de quin punt del procés (fletxa vermella) és obtinguda la mostra:



Figura 10: Esquema del procés de la EDAR de Sant Feliu de Llobregat [28]

El sistema de fangs actius consta d'un reactor de biomassa en suspensió i un decantador per clarificar l'aigua depurada i recuperar la biomassa per recircular-la de nou cap al reactor. La biomassa en aquests sistemes és un conjunt de microorganismes els quals són capaços de consumir matèria orgànica i eliminar nutrients principalment nitrogen, amb processos de nitrificació i desnitrificació, i part del fòsfor [28]. Entre aquests microorganismes trobem principalment bacteris i també diferents espècies de protozous i metazous que són bioindicadors del funcionament del procés depuratiu. En la figura 11 es pot veure un detall de la biomassa utilitzada on s'observen uns bons agregats bacterians junt amb alguns dels organismes bioindicadors:

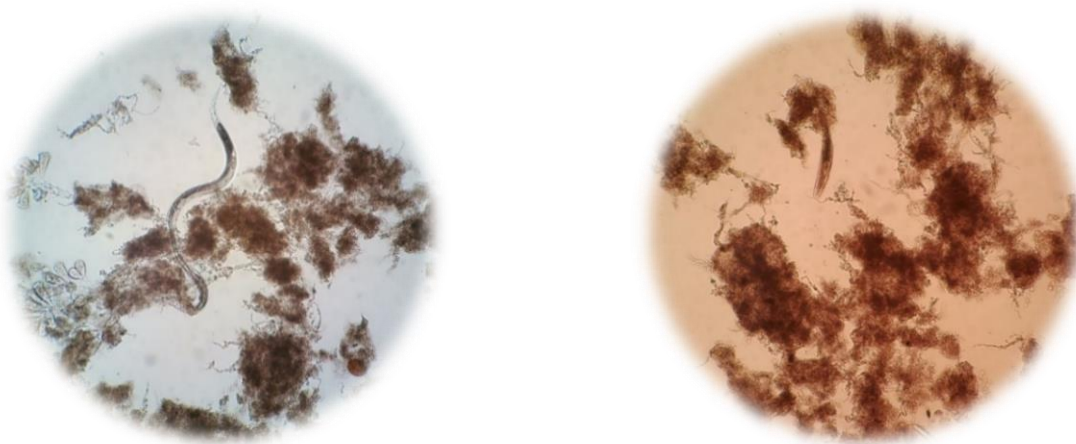


Figura 11: Imatges del microscopi (*Epistylis plicatilis*, nemàtode i *Litonotus fasciola*)

Per a les mesures de fang activat, s'han dut a terme mesures de quatre mostres de diferent concentració, més una d'aigua clarificada obtinguda de la seva decantació. Realitzant dos tipus de condició de mesura: la primera on es mesura la concentració explícitament, és a dir, mesurant la concentració homogènia i la segona per sedimentació, causant un canvi de concentració local i mesurant diferents estadis de concentració, per veure si som capaços de identificar canvis en la impedància quan la mostra sedimenta.

3.2. Instrumentació per l'estudi de l'EIE

Cada mesura s'ha realitzat en el mateix dia de l'obtenció de la mostra, o en el cas d'alguna mesura en concret es comentarà específicament quants dies a posteriori ha sigut realitzada. Les lectures de bioimpedància s'han realitzat amb l'analitzador Agilent 4294A, ubicat a l'EETAC. L'instrument de mesura emprat té una incertesa bàsica de 0,08 % i és capaç de realitzar estudis d'EIE amb dos elèctrodes en un rang de freqüències des de 40 Hz fins a 110 MHz.

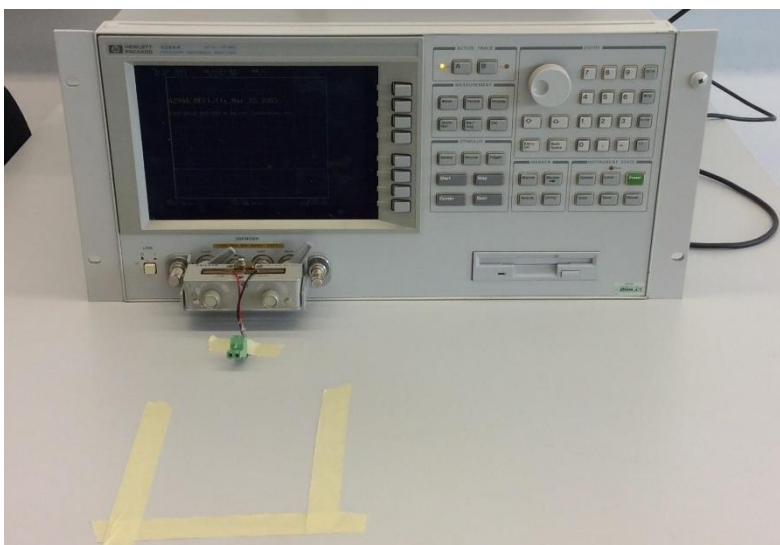


Figura 12: Analitzador d'impedància Agilent 4294A amb les marques de la posició de la mesura

El recipient de la mostra sempre roman a la mateixa posició i els cables a la mateixa distància de l'analitzador d'impedància per evitar efectes no desitjats i poder comparar les lectures obtingudes entre elles. Totes les mesures s'han realitzat en els mateixos recipients cilíndrics, de polietilè, d'un litre de capacitat i configurats amb tres elèctrodes, per a realitzar mesures de dos elèctrodes en connexió oposada i adjacent (Figura 13). Els cargols dels elèctrodes són de mida M3 d'acer inoxidable, tipus 316L.

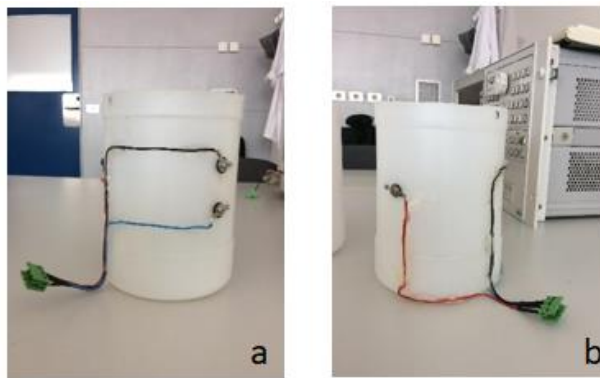


Figura 13: Configuració dels elèctrodes on: a) Elèctrodes adjacents; b) Elèctrode oposat

L'analitzador d'impedància és connectat a l'ordinador mitjançant USB, i des de l'ordinador s'executa un instrument virtual programat amb LabVIEW[®] on es configuren els paràmetres de la lectura, els quals han sigut sempre els mateixos. Concretament, s'ha fet una mesura de la magnitud i la fase de la impedància de cada mostra, amb un escombrat logarítmic de 201 freqüències entre els 100 kHz i els 50 MHz (Figura 14).

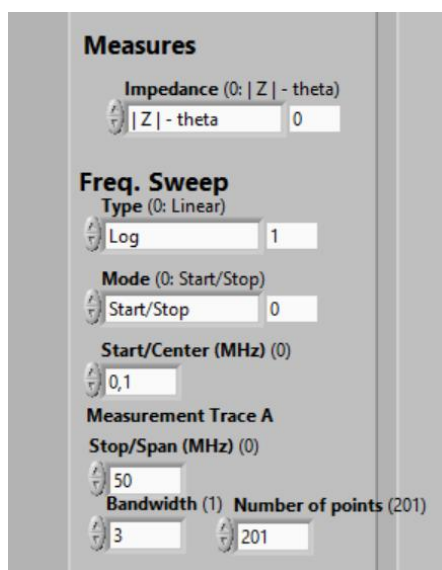


Figura 14: Captura de pantalla del programa de LabVIEW[®] amb els paràmetres usats

Es requereix d'un temps d'espera d'entre 15 minuts i 20 minuts un cop s'encén l'analitzador d'impedància abans d'utilitzar-se, degut a que tarda un cert temps en establir-se la temperatura de treball (*warm-up time*). No esperar aquest temps pot introduir derives en les mesures. Un cop transcorregut aquest temps, es procedeix a connectar els cables dels elèctrodes, en formació adjacent o oposada. Degut a la dependència entre la impedància i la conductivitat, sempre s'ha mesurat la conductivitat i temperatura de la mostra abans i després de realitzar la mesura, intentant sempre realitzar les lectures a una temperatura constant de la mostra ($\pm 1^\circ\text{C}$).

3.3. Mètode de mesura del pendent

En aquest treball, un objectiu és simplificar l'estudi de la impedància basant-nos no en la caracterització de la dispersió β (la qual cosa implica l'ajustament de les dades de l'EIE a un model) sinó en la mesura del pendent de la magnitud de l'espectre d'impedància en el qual es troba la "zona plana" (Figura 15). En aquesta zona no hi ha d'haver pràcticament canvi en l'espectre, però té un petit pendent el qual està relacionat, amb l'inici del "genoll" on es troba la dispersió β i, per tant, amb la concentració de biomassa de la mostra. És a dir, un canvi en la dispersió β genera un canvi en el pendent per un mateix rang de freqüències. El principal avantatge d'aquesta proposta és la gran reducció en la complexitat de l'instrument de mesura necessari (i, per tant, del seu cost) i de la simplificació de l'anàlisi de dades.

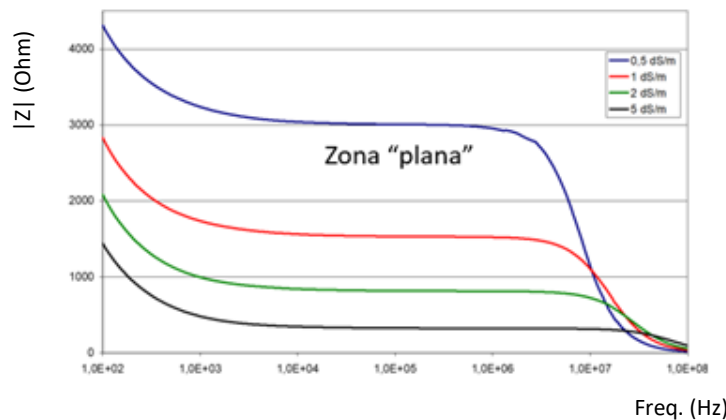


Figura 15: Gràfic on es mostra la zona "plana" de la qual volem saber pendent.

En aquest treball hem triat freqüències de 100 kHz i 1 MHz per a calcular el pendent. El valor de la freqüència baixa de 100 kHz ens ve determinada pel comportament de l'elèctrode, i degut a que són els mateixos elèctrodes emprats en el treball de Cantons [8], hem obtingut el valor del seu treball. La freqüència alta depèn del volum i la concentració de la mostra, per tant l'hem determinat empíricament, ja que hem observat que entre 1 i 10 MHz s'observa la segona caiguda en la lectura d'impedància. Per evitar efectes de distorsió en la mesura a molt altes freqüències, i degut a la limitació de la instrumentació, determinem el segon punt del pendent a 1 MHz.

Però, en lloc de calcular directament el pendent entre dues freqüències, s'ha optat per normalitzar aquest pendent respecte de la impedància a baixa freqüència, de la següent manera:

$$Pendent = \frac{|Z(100 \text{ kHz})| - |Z(1 \text{ MHz})|}{|Z(100 \text{ kHz})|} \cdot 100\% \quad (9)$$

Aquest pendent normalitzat es fa servir donat que el factor de cel·la K és diferent per la configuració d'elèctrodes adjacents que per la d'oposats, i la normalització elimina aquest factor.

3.4. Interferències en la mesura d'impedància

Aquesta tècnica de mesura presenta certes limitacions. Podem separar-les en interferències de dos tipus: ambientals i electromagnètiques.

Com a interferència ambiental, tindríem la temperatura, podem observar a l'equació 10, el resultat de la mesura depèn àmpliament de la conductivitat de la mostra, i per tant alhora depèn de la temperatura (T).

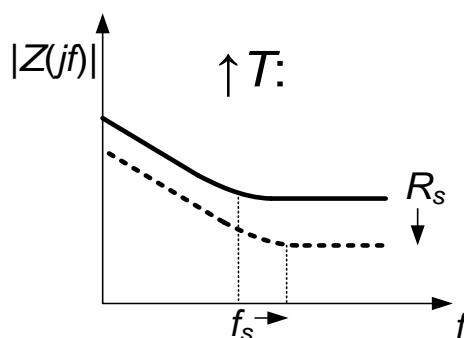


Figura 16: Gràfic impedància respecte freqüència

$$R_s = \frac{K}{\sigma_{25} \cdot [1 + 0,02 \cdot (T - 25^\circ C)]} \quad (10)$$

Una altre interferència ambiental, que més aviat és una interferència de la pròpia mostra, és la del contingut viu. En aigües residuals és habitual la presència d'organismes més grans, com per exemple nematodes, els quals no són microorganismes i poden interferir en la mesura de la impedància i en la sedimentació de la mostra.

En quan a les interferències electromagnètiques, existeixen diverses fonts. Per una banda, el cablejat introdueix una capacitat paràsita que es veu reflectida en el valor de C_m . Per tal de minimitzar-la, s'han utilitzat cables el més curts possibles, i col·locant la mesura sempre en la mateixa posició, com es pot veure a la Figura 17:

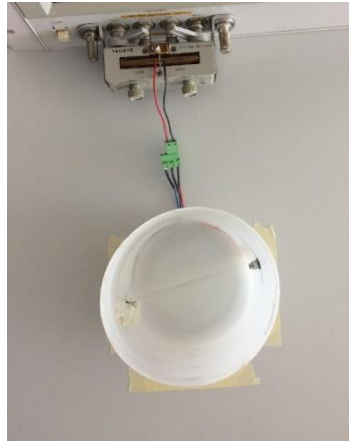


Figura 17: Posició del recipient de mesura respecte l'analitzador

També per a reduir interferències degut al cablejat, es va modificar un dels recipients fent que els cables estiguessin més separats.

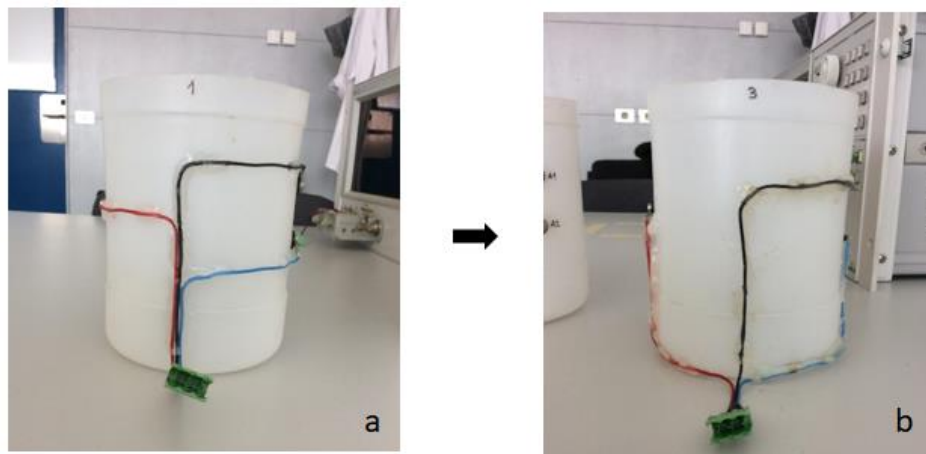


Figura 18: Les dues configuracions de recipients on: a) Pot V; b) Pot N

L'instrument de mesura està connectat a terra. Tal i com ha estudiat Aliau [29], en aquest tipus d'instruments, i depenent del volum de la mostra a mesurar, poden haver-hi fuites del camp elèctric (aplicat entre els elèctrodes de mesura) a través de la capacitat paràsitica entre el volum mesurat i terra, C_g . L'efecte principal és l'aparició d'unes certes ressonàncies (pics) que es poden observar a altes freqüències, i que distorsionen la mesura. En el cas d'aquest treball, s'ha observat aquest fenomen a partir dels 10 MHz i, per tant, s'han desestimat els valors d'impedància superiors a aquesta freqüència. Per tal de reduir el soroll electrònic típic dels sistemes de mesura, escollim un ample de banda petit. Un altre interès en les millores fetes al sistema és que el canvis que detectem siguin el més grans possibles per a relaxar els requeriments del sistema futur.

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, la impedància dels elèctrodes degut al fenomen de polarització pot influenciar molt en les mesures, a la Figura 19, podem observar el model de circuit de la impedància dels elèctrodes Z_e :

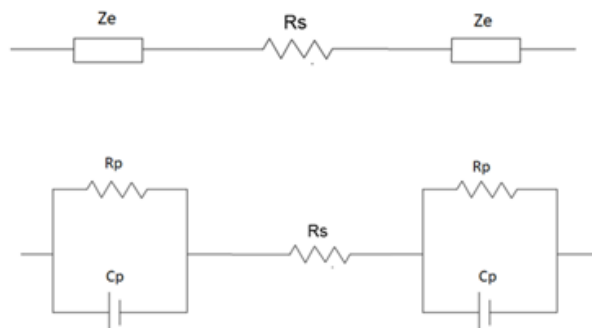


Figura 19: Model circuit simplificat i en detall de la impedància dels elèctrodes

Passada la freqüència f_p , comença a dominar la reactància de C_p ,

$$X_{Cp} = \frac{1}{j\omega C_p} \quad (11)$$

A major freqüència, la reactància, que depèn de la freqüència, fa que Z_e sigui negligible. Per tant, triem freqüències que ens permetin no veure aquest fenomen, per això treballem a partir de 100 kHz, sobre dels quals ja no afecta aquest fenomen, i amb la qual Z_e serà com un cable. Hi ha algunes interferències externes que cal evitar, per exemple, l'agitació magnètica no és possible a causa de les interferències elèctriques en la mesura.

Degut a que les interferències són part de l'experiment, a part d'intentar reduir-les, totes les lectures d'impedància s'han dut a terme sota les mateixes condicions (posició dels cables, el recipient de mesura, temperatura, conductivitat de la mostra...) per tal de que puguem comparar-les entre si.

3.5. Mètodes analítics

Cada anàlisi que s'ha realitzat s'ha dut a terme en menys de 7 dies de la seva obtenció, i seguint el protocol de l'IRTA com es pot veure seguidament [30].

Com s'ha comentat anteriorment, la temperatura i la conductivitat elèctrica es va mesurar in-situ durant la mesura d'impedància. Altres mètodes que es varen utilitzar van ser l'anàlisi de Sòlids Suspesos Volàtils i Sòlids Suspesos Totals (SSV i SST respectivament) els quals es van realitzar als laboratoris de l'ESAB, Castelldefels.

3.5.1. Temperatura i CE

La temperatura i la conductivitat elèctrica (CE) han sigut determinades amb una sonda Multi 340i (WTW) de conductivitat amb compensació automàtica de temperatura. L'instrument es col·loca dins de la mostra i s'espera aproximadament 30 segons fins que s'estabilitza la lectura, que dona la temperatura i la CE a 25 °C. La temperatura i la conductivitat ha sigut mesurada abans de realitzar cada mesura d'impedància.

3.5.2. SST i SSV

Sòlids suspesos totals són tots aquells sòlids que no passen per un filtre de microfibra de vidre amb un diàmetre de porus d'1 µm. Això inclou tant els sòlids que s'assentaran o floten en el clarificador i els sòlids més lleugers. Inclouen tot tipus de partícules, orgàniques i inorgàniques.

Sòlids suspesos volàtils són aquella part dels SST que es volatiliza a 550 °C, és a dir, la part orgànica dels SST. Els SSV és la unitat emprada per a conèixer la concentració de biomassa del reactor en plantes de tractament d'aigües residuals.

El procediment dut a terme segueix el protocol [30] del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), basat en el mètode [31], el qual s'explica a continuació:

Materials:

- Gresols de porcellana
- Dessecador
- Kitasato
- Embut Büchner
- Filtres de microfibra de vidre
- Vas de precipitats de 20 ml
- Estufa a 105 °C
- Forn de mufla a 550 °C
- Balança analítica (Kern AEJ, amb precisió de 0,0001 g)

Condicionament del material:

- Els gresols han d'estar nets amb aigua desionitzada de qualitat analítica, i identificats a la base en llapis.
- Els filtres han d'estar anteriorment filtrats amb aigua desionitzada de qualitat analítica, i assecats a 105 °C.

Procediment:

1. Pesar el filtre amb el gresol que li correspongui i anotar el pes A (en grams).

2. Col·locar el filtre sec dins del embut Büchner.
3. Afegir aigua desionitzada per fixar-lo i iniciar la succió amb bomba de buit.
4. Pesar el volum de mostra que desitgem, pes B, en un vas de precipitats, i abocar la mostra sobre el filtre (ha de ser suficient per ser representatiu però que no obturi el filtre).
5. Netejar el vas de precipitat amb aigua desionitzada, per tal de recollir tota la mostra.
6. Un cop filtrat completament, col·loquem els gresols amb els filtres amb la mostra a l'estufa a 105 °C durant 24 hores.
7. Deixar refredar al dessecador i pesar a la balança analítica el pes C.
8. Col·locar els gresols a la mufla i escalfar a 550 °C durant 3 hores i mitja.
9. Deixar refredar la mostra, i col·locar-la al dessecador durant 1 h.
10. Pesar i anotar el pes D.

Per a la determinació dels SST, s'utilitza la següent equació:

$$SST (\%) = \frac{(C-A)}{B} \cdot 100 \quad (12)$$

Per a la determinació dels SSV, s'utilitza la següent equació:

$$SSV (\%) = \frac{(C-D)}{B} \cdot 100 \quad (13)$$

On A, B, C i D tenen unitats en g.

3.5.3. Ajustament de les dades d'EIE al model circuital

La informació de les mesures d'impedància elèctrica obtingudes mitjançant LabVIEW[®] es guarda sempre en arxius de text. Amb l'ajuda de MatLab, s'han llegit els fitxers de text i s'ha realitzat l'ajustament de dades d'EIE de 100 kHz fins als 10-20 MHz (depenent de la mostra) a un model elèctric, amb una llibreria que s'anomena Zfit [32]. Un cop importem les dades a aquesta llibreria, realitzem les gràfiques del mòdul i la fase de la impedància, com es poden veure a les figures 20 i 21:

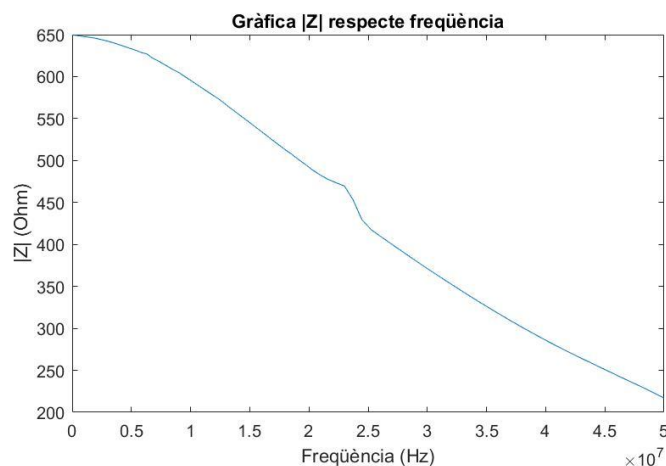


Figura 20: Gràfic mòdul de la impedància respecte de la freqüència

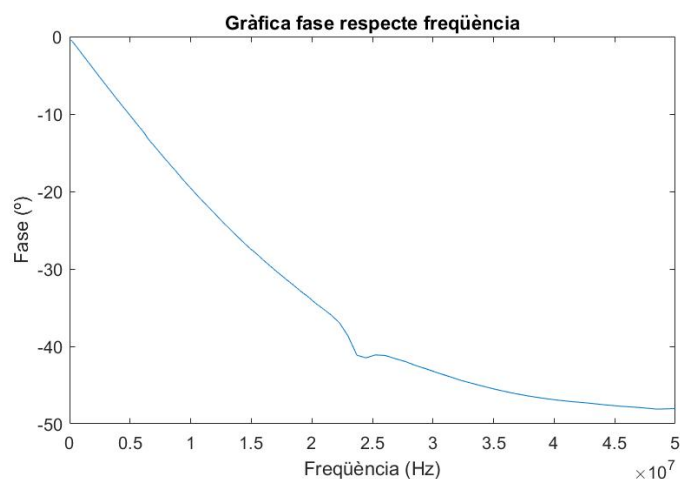


Figura 21: Gràfic fase de la impedància respecte de la freqüència

La Figura 20 mostra clarament la presència d'un pic al voltant dels 20 MHz per aquella mostra en concret. La posició d'aquest pic dependrà de paràmetres com ara la conductivitat elèctrica de la mostra, i que en alguns casos ha aparegut a freqüències properes als 10 MHz, per la qual cosa s'han fet servir les dades d'impedància inferiors a la posició del pic.

La llibreria Zfit treballa amb les parts real i imaginària de la impedància, que també s'han calculat amb MatLab, ja que en EIE, és una pràctica comú realitzar una gràfica de Nyquist. L'avantatge d'aquesta gràfica és que permet identificar els circuits RC (el model de la Figura 4 n'és un exemple) amb la presència de semicercles o arcs, però la dependència amb la freqüència ja no és explícita. Qualitativament, l'extrem dret correspon a la freqüència més baixa, i conforme avancem cap a l'esquerra sobre la corba de la gràfica, la freqüència augmenta. Com podem veure a la Figura 22, veiem un arc definit fins a una determinada freqüència on hi ha una interferència (ressonància):

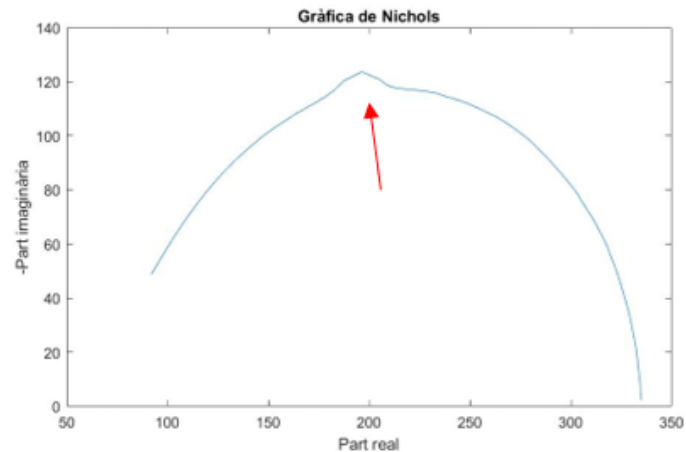


Figura 22: Gràfic de Nyquist. La fletxa vermella indica l'efecte d'un pic de ressonància

Un cop hem decidit el rang de freqüències amb el qual treballarem, escollim el tipus de model circuital que més s'ajustarà a la nostra mesura. Un cop realitzat l'ajustament de dades, la llibreria ens dona el valor de cada element d'aquest circuit, així també el pendent entre el rang de freqüència escollit.

Per a la comparació de valors hem utilitzat Excel per a realitzar la recopilació de tota la informació obtinguda i la realització de gràfiques que podem observar i comparar al següent apartat, *Resultats i discussió*.

4. Resultats i discussió

4.1. Mostra de llevat amb aigua destil·lada

El primer mostratge ha consistit en afegir a un litre d'aigua destil·lada un cultiu pur, llevat comercial, i veure com afectava cada augment de la seva concentració. Degut a la baixa conductivitat, aquesta primera mostra es va ajustar a un model més senzill compost d'una resistència en paral·lel a una capacitat. Els valors obtinguts de temperatura i conductivitat al llarg de les lectures es pot observar a la següent taula:

Taula 1: Valors de temperatura i conductivitat per cada concentració de llevat comercial

Concentració (g/L)	Temperatura (°C)	Conductivitat (μS/cm)
0	19,3	15
1	19,5	27
2	19,6	35
3	19,7	46
4	19,9	54
5	19,9	62
6	20,4	76
7	20,5	84
8	20,6	93
9	20,6	102
10	20,7	110

A la taula 2 es recullen els valors obtinguts de la resistència (R), la capacitat (C) i el pendent, amb configuració d'elèctrodes adjacent i oposada:

Taula 2: Valors dels elements circuital i del pendent de la mostra de llevat

		Connexió adjacent			Connexió oposada		
Concentració (g/L)	SSV (%)	R (kOhm)	C (pF)	Pendent (%)	R (kOhm)	C (pF)	Pendent (%)
0	0,00	50,96	27,5	83,6	56,86	26,3	84,3
1	0,03	26,63	33,7	75,1	29,90	31,5	76,4
2	0,06	20,60	34,3	69,7	23,06	31,2	71,2
3	0,09	15,97	28,8	61,7	18,05	25,9	62,2
4	0,12	13,55	29,6	56,6	15,33	26,3	56,8
5	0,15	11,70	29,4	51,0	13,23	27,1	52,0
6	0,18	9,54	31,2	44,2	10,83	27,8	44,8
7	0,21	8,55	31,7	40,3	9,71	28,5	41,1
8	0,24	7,71	33,3	36,9	8,76	29,0	37,1
9	0,27	7,00	34,1	33,5	7,96	30,0	33,7
10	0,30	6,42	34,8	30,7	7,36	30,5	31,1

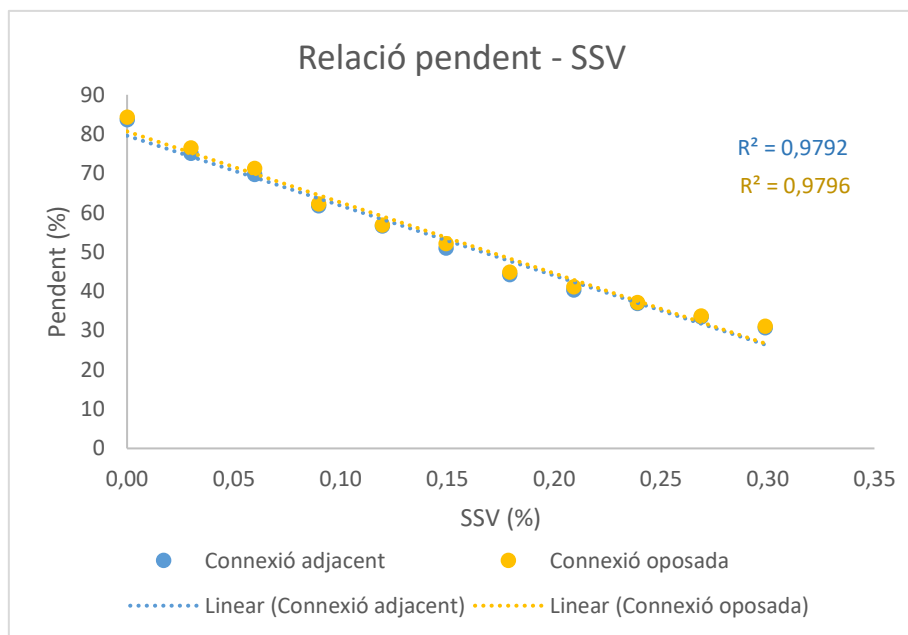


Figura 23: Gràfic de la evolució del pendent amb l'addició de llevat

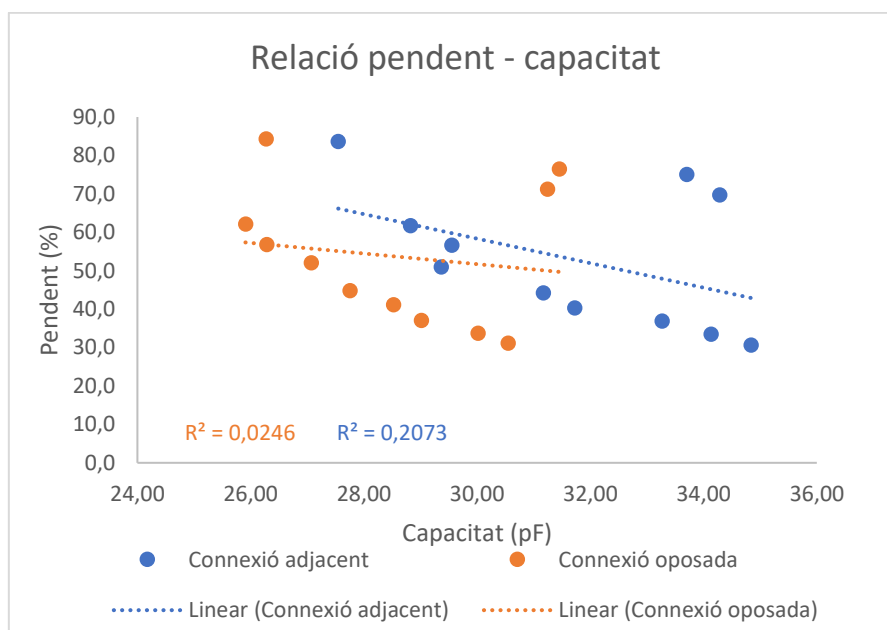


Figura 24: Gràfic de la evolució del pendent respecte la capacitat

Com podem observar a les gràfiques, hi ha una relació lineal entre els SSV de la mostra i el pendent de la impedància, obtenint un coeficient de determinació de 0,9792 per la configuració d'elèctrodes adjacents i de 0,9796 per la d'elèctrodes oposats. Però, en el cas de la gràfica del pendent respecte la capacitat, no es veu una relació lineal. El fet d'obtenir una baixa relació entre la capacitat i el pendent pot ser degut a la baixa conductivitat de l'aigua destil·lada. Una baixa conductivitat del medi pot afectar a les membranes cel·lulars, i per tant la capacitat de la membrana no ens mostraria la quantitat de biomassa.

4.2. Mostra de llevat amb aigua de l'aixeta

Degut a la baixa relació entre el pendent i la capacitat de la membrana, es va decidir repetir l'experiment anterior, però utilitzant aigua de l'aixeta, la qual té una conductivitat més alta, i més semblant a la que ens trobaríem en una suspensió cel·lular d'un bioreactor. En aquestes mesures el model ja s'ajustava a l'explicat en l'apartat de Conceptes bàsics. Els valors obtinguts de temperatura i conductivitat al llarg de les lectures es pot observar a la següent taula:

Taula 3: Valors de temperatura i conductivitat de la mostra de llevat

Concentració (g/L)	Temperatura (°C)	Conductivitat (μS/cm)
0	23,90	1370
1	23,80	1379
2	23,70	1384
3	23,50	1390
4	23,40	1398
5	23,50	1402
6	23,50	1409
7	23,40	1416
8	23,30	1425
9	23,30	1432
10	23,20	1439

A la taula 4 es recullen els valors obtinguts de la R_e , R_i , C_m i el pendent, segons la connexió:

Taula 4: Valors dels elements circuital i del pendent de la mostra de llevat

		Connexió adjacent				Connexió oposada			
Concentració (g/L)	SSV (%)	R_e (Ohm)	R_i (Ohm)	C_m (pF)	Pendent (%)	R_e (Ohm)	R_i (Ohm)	C_m (pF)	Pendent (%)
0	0,00	112	336	27,8	0,34	102	400	24,1	0,31
1	0,03	103	381	25,1	0,37	103	435	22,0	0,36
2	0,06	115	330	28,7	0,50	105	394	24,7	0,47
3	0,09	106	379	27,3	0,64	115	429	23,0	0,61
4	0,12	118	323	29,6	0,68	108	386	25,5	0,66
5	0,15	111	371	27,9	0,86	121	419	23,5	0,86
6	0,18	121	317	30,4	0,82	111	380	26,0	0,81
7	0,21	110	368	28,2	0,97	125	413	24,4	0,95
8	0,24	123	311	31,2	0,97	113	374	26,6	0,95
9	0,27	114	360	29,3	1,12	125	407	24,8	1,11
10	0,30	126	304	32,1	1,12	117	366	27,2	1,11

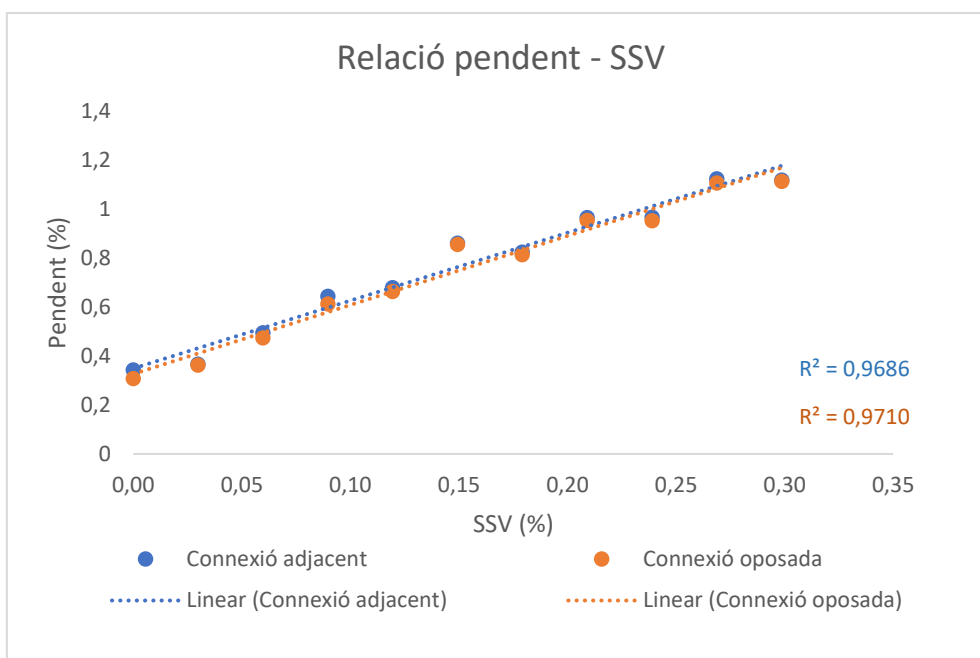


Figura 25: Gràfic evolució del pendent respecte l'addició de llevat

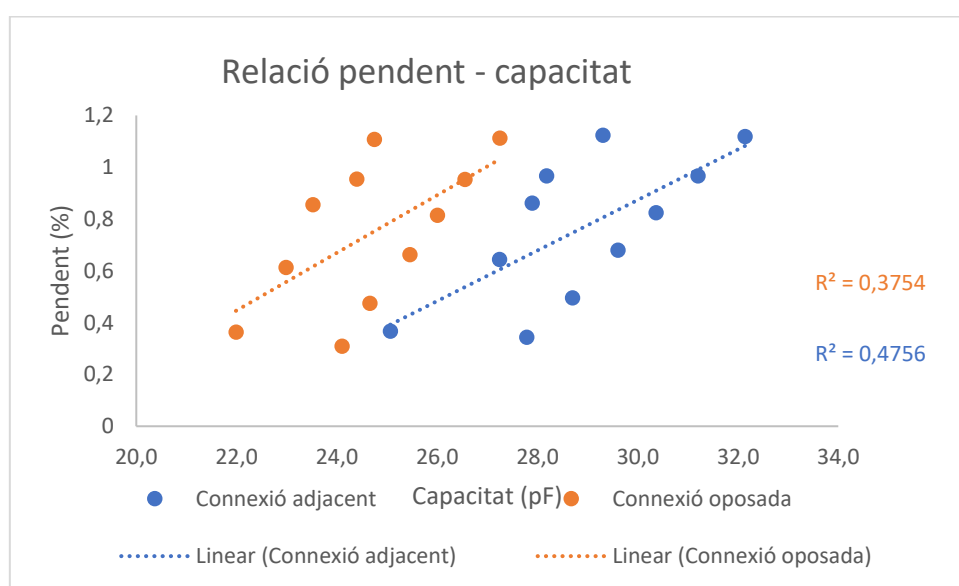


Figura 26: Gràfic evolució pendent respecte capacitat

Com podem observar a les gràfiques, hi ha una relació lineal entre els SSV de les mostres i el pendent de la impedància, obtenint un coeficient de determinació de 0,9686 per la configuració d'elèctrodes adjacents i de 0,9710 per la d'elèctrodes oposats. En el cas del gràfic del pendent respecte la capacitat C_m , es mostren millors resultats que amb aigua destil·lada, i es pot observar una certa relació entre C_m i el pendent.

4.3. Mostra fangs actius 19 de març

La primera mostra de fangs actius va ser obtinguda de l'interior del reactor biològic de la EDAR comentada anteriorment. L'experiment consta de 5 mostres, una d'aigua clarificada, i quatre mostres amb diferents concentracions, com es pot observar a la taula 5. Totes les lectures es van dur a terme el mateix dia de l'obtenció de la mostra, excepte la mostra 4, que es va dur a terme dos dies després, en els quals la mostra va estar emmagatzemada a 4 °C. A l'annex podem observar una taula amb els valor de conductivitat i temperatura de cada una de les lectures de les mostres.

Per les mostres de fangs actius s'han fet dos tipus de lectura, amb les mostres homogènies, és a dir, on es troba la mateixa concentració en tot el recipient sense sedimentació, i lectures de diferents estats de sedimentació, com es pot apreciar a les figures 31, 32 i 33 per a veure com evoluciona el seu pendent quan sedimenta. A la taula 5 es recullen els valors obtinguts de la R_e , R_i , C_m i el pendent, amb configuració d'elèctrodes adjacents i oposats:

Taula 5: Valors dels elements circuitals i pendent de les mostres

		Connexió adjacent				Connexió oposada			
Mostra	SSV (%)	R_e (Ohm)	R_i (Ohm)	C_m (pF)	Pendent (%)	R_e (Ohm)	R_i (Ohm)	C_m (pF)	Pendent (%)
1	0,25	337	229	14,6	0,41	378	191	14,5	0,37
2	0,32	365	201	14,2	0,35	407	200	13,0	0,37
3	0,10	361	189	14,1	0,25	404	195	12,5	0,23
4	0,49	531	120	16,5	0,62	596	105	16,0	0,62
Clarificat	0,01	360	193	14,1	0,24	404	205	12,4	0,22

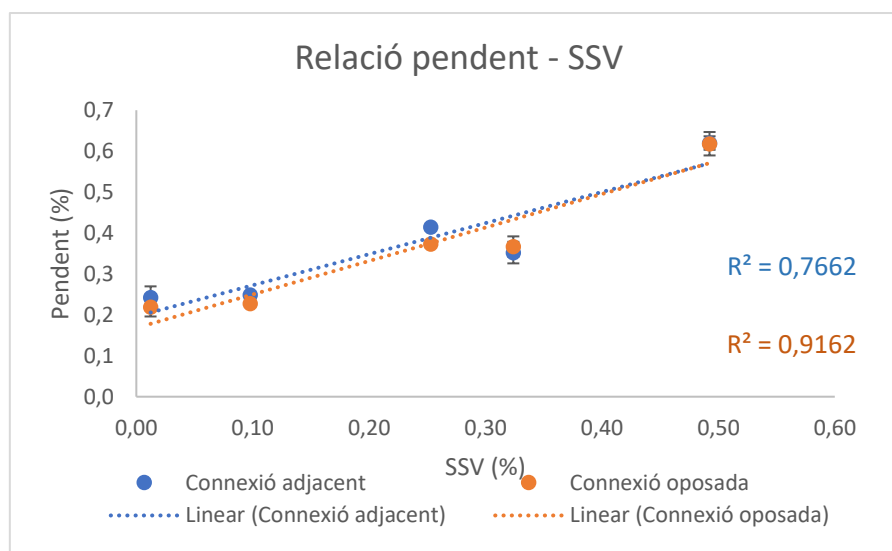


Figura 27: Gràfic de l'evolució del pendent, amb la seva desviació estàndard, i SSV de les mostres

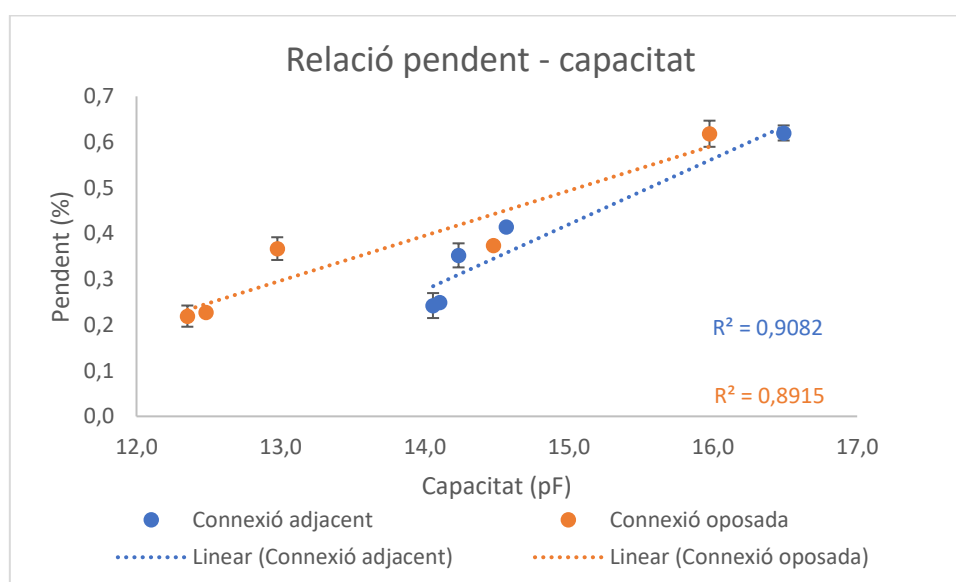


Figura 28: Gràfic de la relació entre el pendent, amb la seva desviació estàndard, i la capacitat de les mostres

Com podem veure a la Figura 27, s'observa una relació bona entre el pendent i els SSV de les mostres, obtenint coeficients de determinació de 0,7662 i 0,9162, en connexió adjacent i oposada respectivament. En el cas de la relació del pendent respecte la capacitat també s'obté una alta relació lineal.

A continuació s'analitza cada mostra per separat per veure com canvia el seu pendent i capacitat durant la sedimentació. Excepte la mostra 3, degut a la seva baixa concentració de SSV, ha sigut impossible registrar la seva evolució degut a la seva ràpida sedimentació.

4.3.1. Mostra 1

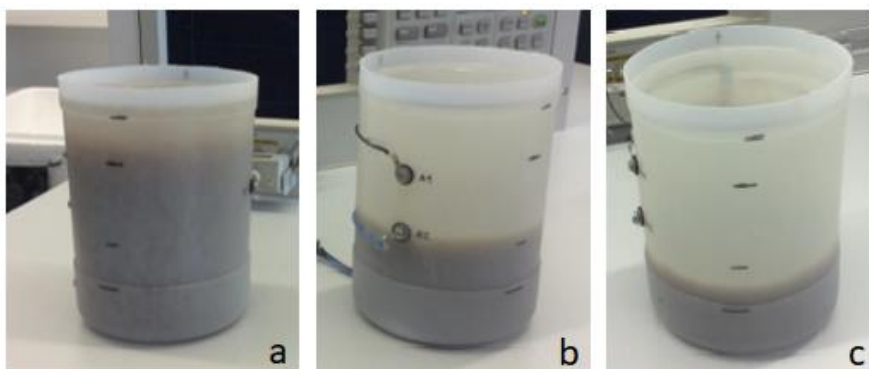


Figura 29: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 1. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2

Taula 6: Valors model circuital i pendent de la mostra 1

		Homogeni	Sediment 1	Sediment 2
Connexió adjacent	R_e (Ohm)	344	353	350
	R_i (Ohm)	229	191	189
	C_m (pF)	14,57	14,07	13,78
	Pendent (%)	0,414	0,263	0,188
Connexió oposada	R_e (Ohm)	385	392	390
	R_i (Ohm)	191	173	170
	C_m (pF)	14,48	13,43	13,21
	Pendent (%)	0,373	0,270	0,197

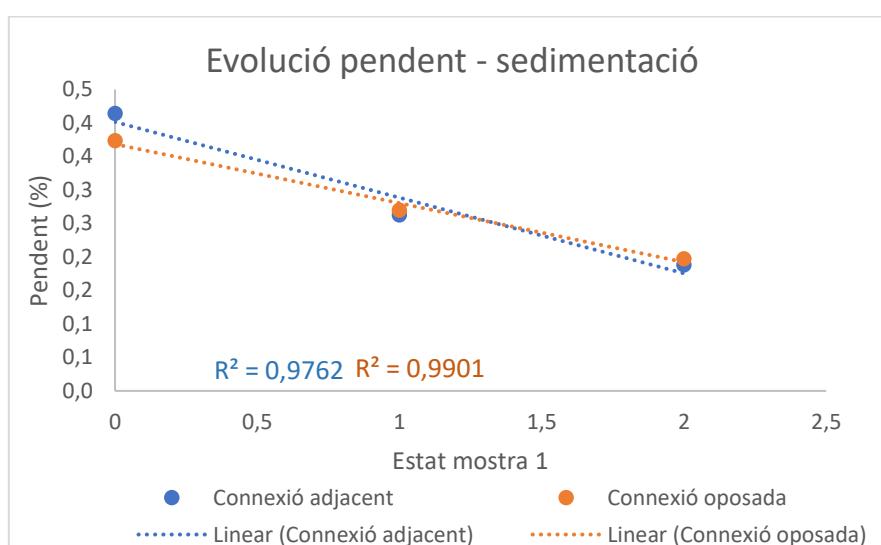


Figura 30: Evolució pendent respecte l'estat de la mostra 1

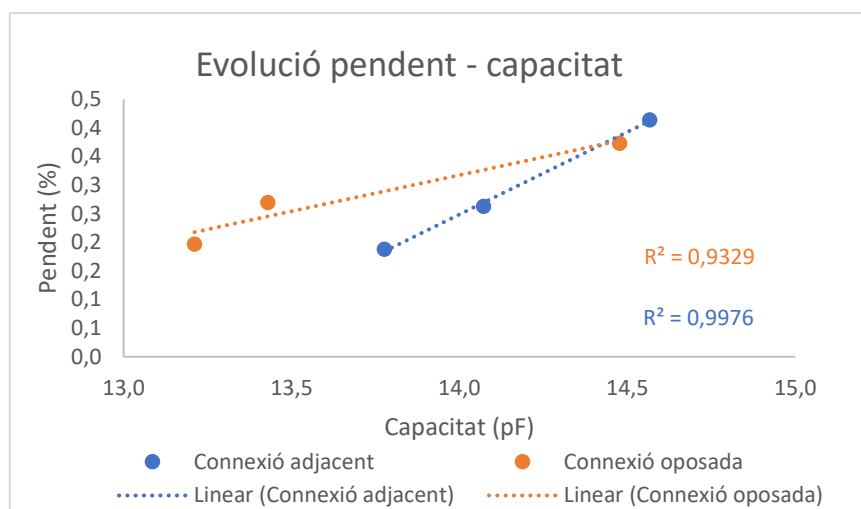


Figura 31: Evolució pendent respecte la capacitat en cada estat de la mostra 1

A la Figura 30 podem observar el pendent en funció de l'estat de la mostra, on 0 és la mostra homogènia, i 1 i 2 són els estats de sedimentació respectius. Es pot veure com, a la mostra 1, el pendent decreix amb l'avanç de la sedimentació, obtenint coeficients de determinació de 0,9762 i 0,9901 per a configuració d'elèctrodes adjacents i oposats respectivament. A la Figura 31, veiem una relació lineal amb coeficients de determinació alts de 0,9329 i 0,9976, entre el pendent i la capacitat de la membrana.

4.3.2. Mostra 2

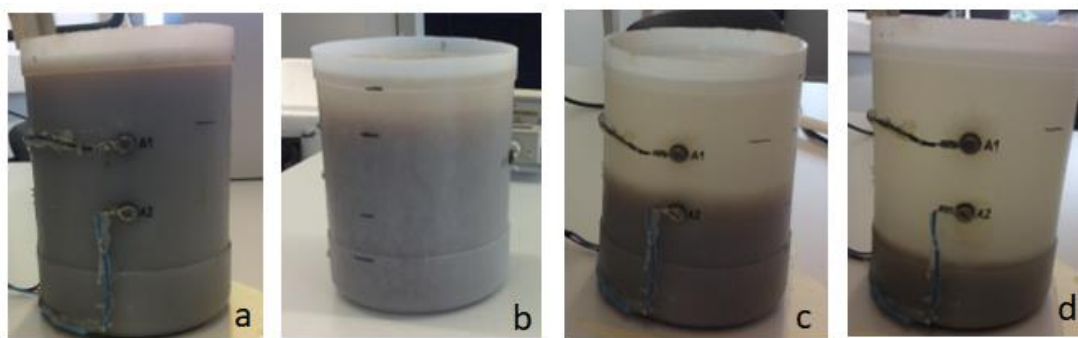


Figura 32: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 2. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2; d) Sedimentació 3

Taula 7: Valors model circuital i pendent, de la mostra 2

		Homogeni	Sediment 1	Sediment 2	Sediment 3
Connexió adjacent	R_e (Ohm)	366	325	322	318
	R_i (Ohm)	201	258	237	241
	C_m (pF)	14,2	13,8	13,9	13,5
	Pendent (%)	0,35	0,40	0,31	0,27
Connexió oposada	R_e (Ohm)	407	363	360	355
	R_i (Ohm)	200	212	182	189
	C_m (pF)	13,0	14,0	14,5	13,8
	Pendent (%)	0,37	0,37	0,26	0,22

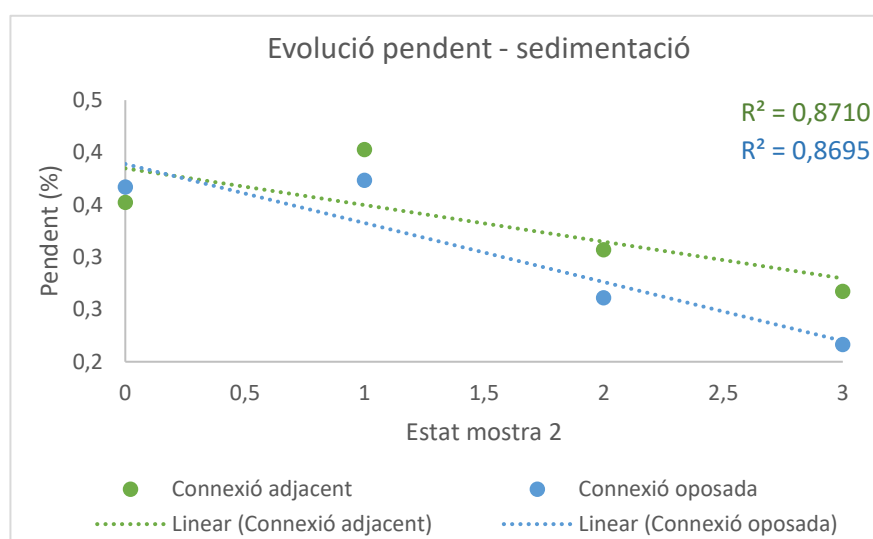


Figura 33: Evolució pendent respecte estat de la mostra 2

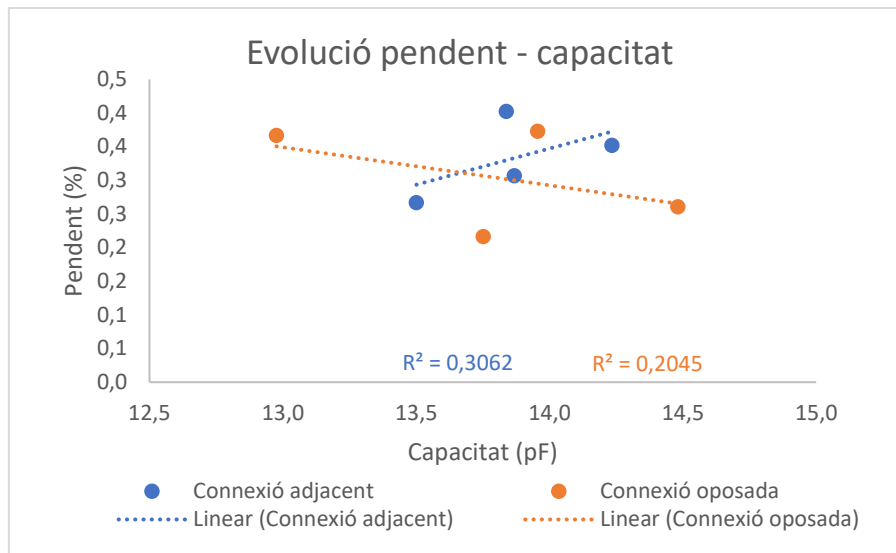


Figura 34: Evolució pendent respecte la capacitat de la mostra 2

En el primer gràfic observem el pendent de la mostra quan va sedimentant, on 0 és l'estat homogeni, i 1, 2 i 3 són els estats de sedimentació respectius. Es pot veure com, a la mostra 2 el pendent decreix amb l'avanç de la sedimentació, obtenint coeficients de determinació de 0,8710 i 0,8695 per a configuració d'elèctrodes adjacents i oposats respectivament. En el segon gràfic, no es veu relació entre el valor del pendent i la capacitat de la mostra en cada estat, això pot ser degut a un mal estat de les membranes cel·lulars.

4.3.3. Mostra 4

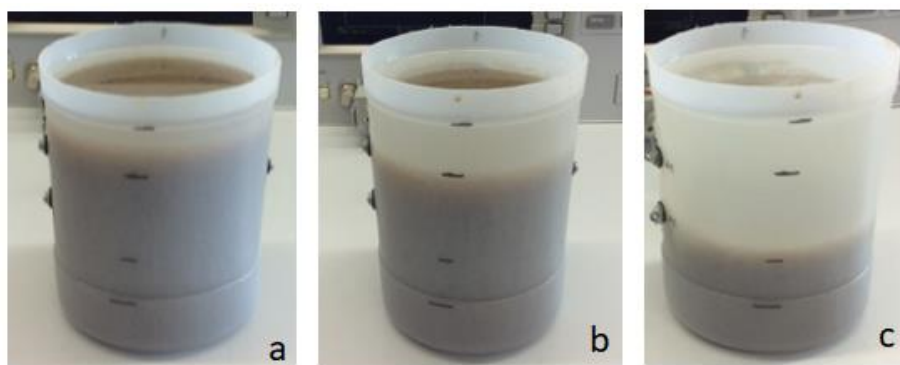


Figura 35: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 4. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2

Taula 8: Valors model circuital i pendent, de la mostra 4

		Homogeni	Sediment 1	Sediment 2
Connexió adjacent	R_e (Ohm)	531	504	506
	R_i (Ohm)	120,0	125,5	117,8
	C_m (pF)	16,49	16,33	16,25
	Pendent (%)	0,62	0,58	0,42
Connexió oposada	R_e (Ohm)	596	567	567
	R_i (Ohm)	104,6	111,3	102,1
	C_m (pF)	15,98	15,75	15,61
	Pendent (%)	0,62	0,57	0,39

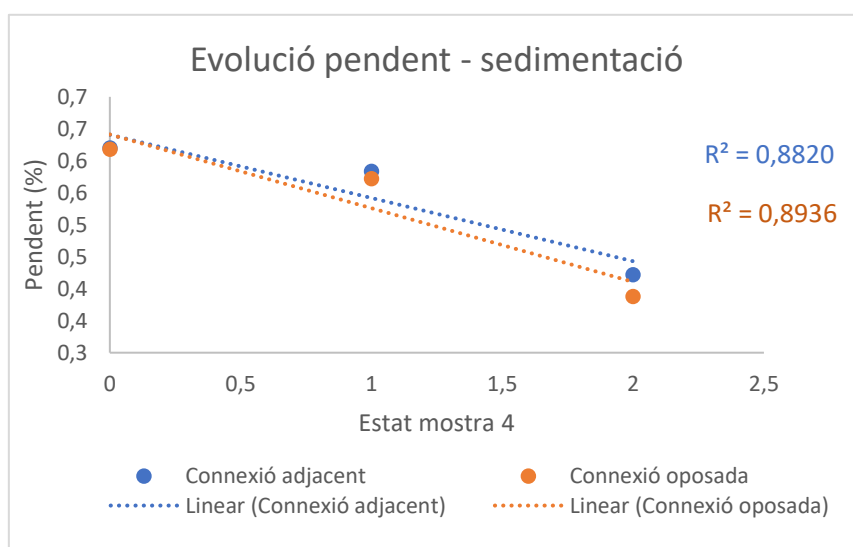


Figura 36: Evolució del pendent respecte la sedimentació de la mostra 4

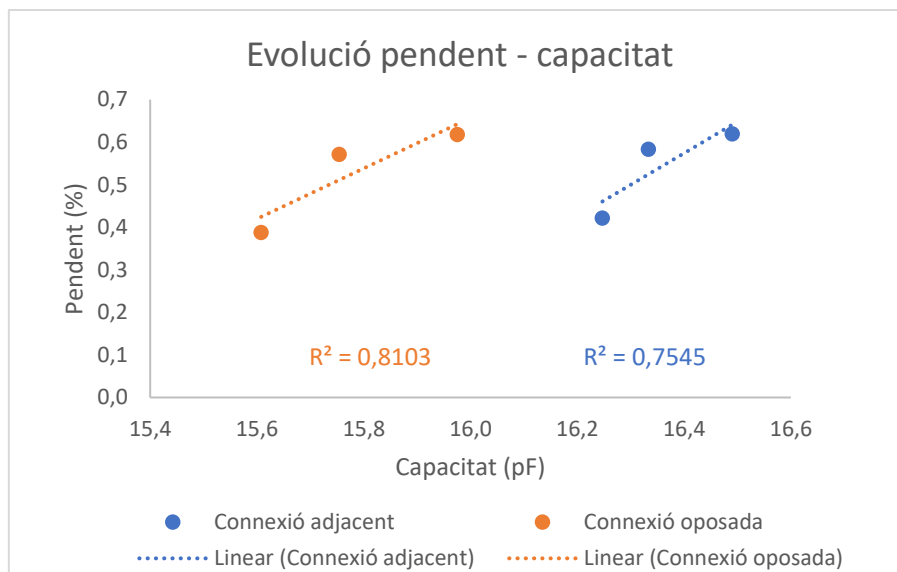


Figura 37: Evolució del pendent respecte la capacitat de la mostra 4

En el primer gràfic, es pot veure com el pendent decreix amb l'avanç de la sedimentació, obtenint una relació lineal entre el pendent i l'estat de sedimentació, amb coeficients de determinació de 0,8820 i 0,8936 per a configuració d'elèctrodes adjacents i oposats respectivament. En el cas de la relació pendent-capacitat de la membrana, s'observa una relació lineal alta amb coeficients de determinació de 0,8103 i 0,7545.

4.4. Mostra fangs activats 25 d'abril

La següent tanda de mostres prové de la recirculació del reactor biològic de la EDAR. En aquestes mesures hem introduït una millora d'un dels recipients de mesura, explicada a l'apartat *d'Interferències en la mesura d'impedància* i per tant hem realitzat dos apartats diferents per a cada recipient, els quals anomenarem *pot V* al que hem estat utilitzant fins ara, i el qual té una configuració dels cables com la de la Figura 38:



Figura 38: Configuració del pot V

El *pot N* és una modificació d'un pot normal on s'han separat els cables:



Figura 39: Configuració del pot N

Totes les mesures es van dur a terme el mateix dia, excepte les mostres de clarificat i de la mostra 4, les quals es van realitzar cinc dies posteriors, en els quals les mostres van estar emmagatzemades a 4 °C. A l'annex podem observar una taula amb els valor de conductivitat i temperatura de cada una de les lectures de les mostres.

4.4.1. Mesures amb el pot V

A continuació podem observar lectures de quatre mostres més una cinquena del clarificat obtingut, i la seva comparació en relació al pendent. Després podem analitzar per separat les mostres 1, 2 i 3 i com varia el seu pendent al llarg de la seva sedimentació.

Taula 9: Valors dels elements circuital i del pendent de la mostra

Mostra	SSV (%)	Connexió adjacent				Connexió oposada			
		R _e (Ohm)	R _i (Ohm)	C _m (pF)	Pendent (%)	R _e (Ohm)	R _i (Ohm)	C _m (pF)	Pendent (%)
1	0,5	116	215	33,6	0,41	126	246	28,3	0,40
2	0,5	130	167	43,4	0,43	117	215	33,1	0,40
3	0,3	124	1767	40,0	0,36	111	224	31,1	0,32
4	0,2	105	229	30,5	0,24	118	258	26,0	0,22
Clarificat	0,0	103	239	29,1	0,19	115	269	24,9	0,20

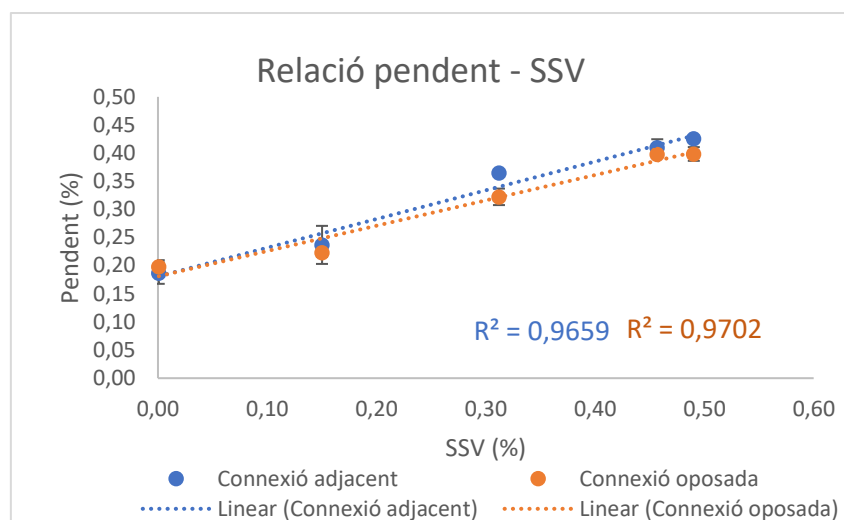


Figura 40: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte SSV de les mostres

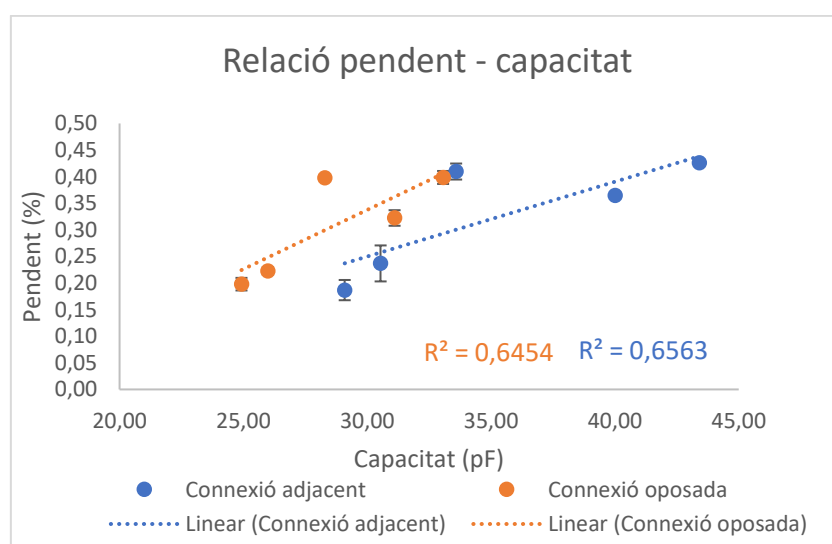


Figura 41: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat de les mostres

En aquestes dues gràfiques trobem relació entre el pendent sobretot amb la concentració SSV i també hi ha força relació amb la capacitat.

4.4.1.1. Mostra 1

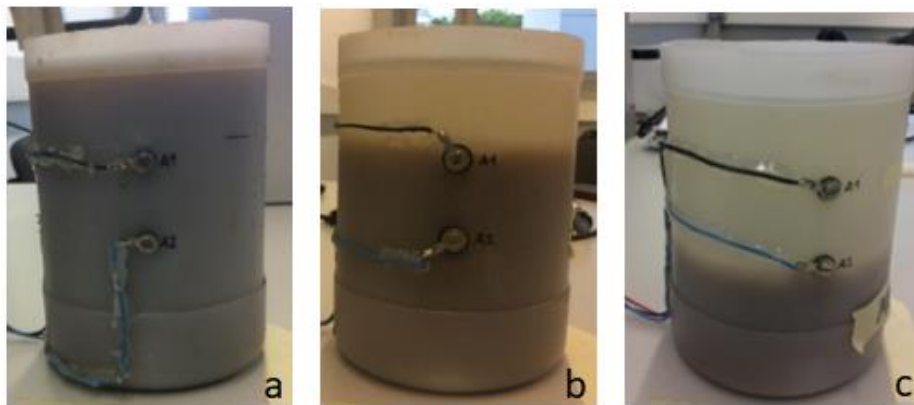


Figura 42: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 1. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2

Taula 10: : Valors model circuital i pendent, de la mostra 1

		Homogeni	Sediment 1	Sediment 2
Connexió adjacent	R_e (Ohm)	116,3	112,9	109,3
	R_i (Ohm)	214,7	215,6	213,7
	C_m (pF)	33,6	33,2	31,7
	Pendent (%)	0,41	0,38	0,22
Connexió oposada	R_e (Ohm)	126,3	123,5	117,9
	R_i (Ohm)	245,5	244,3	245,0
	C_m (pF)	28,3	27,5	26,4
	Pendent (%)	0,40	0,29	0,19

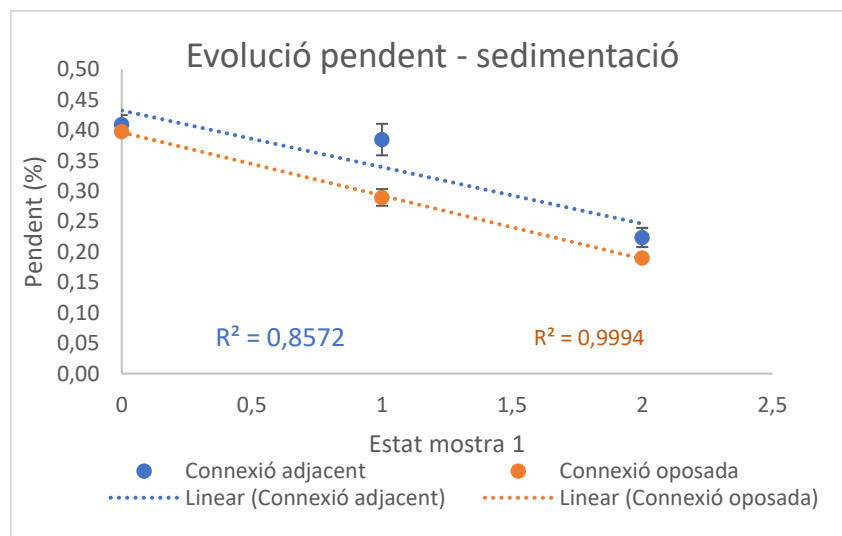


Figura 43: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, i estat de la mostra 1

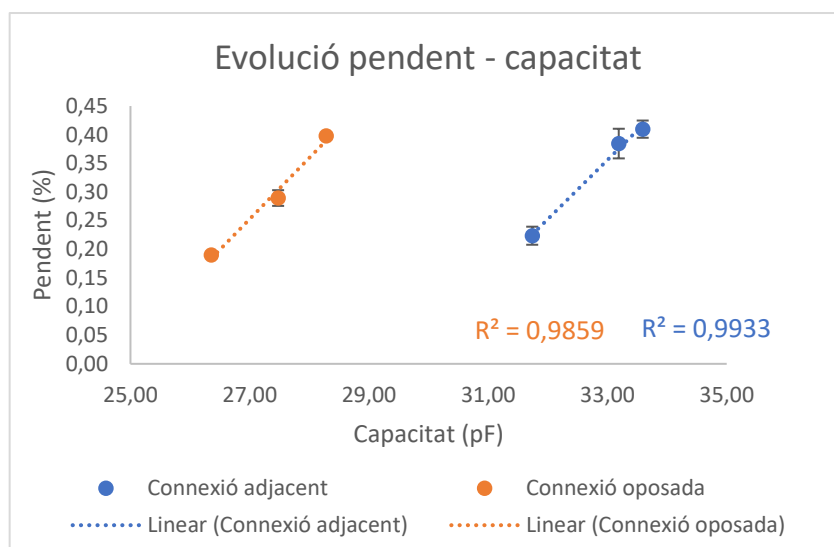


Figura 44: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte la capacitat de la mostra 1

En el gràfic de la Figura 43, podem observar l'estat de la mostra on a 0 és homogeni, i 1 i 2 on els estats de sedimentació respectius. Tant en la relació pendent-SSV com pendent-capacitat s'observa una bona relació lineal amb coeficients de determinació alts.

4.4.1.2. Mostra 2

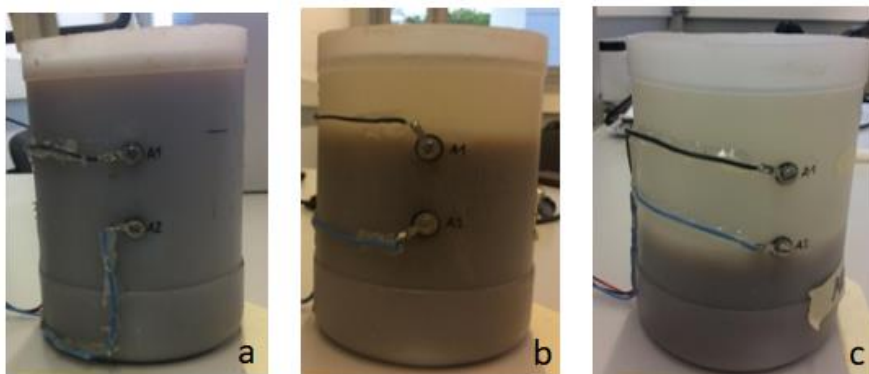


Figura 45: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 2. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2

Taula 11: Valors model circuital i pendent, de la mostra 2

		Homogeni	Sediment 1	Sediment 2
Connexió adjacent	R_e (Ohm)	130	129	116
	R_i (Ohm)	167	167	188
	C_m (pF)	43	43	36
	Pendent (%)	0,43	0,42	0,29
Connexió oposada	R_e (Ohm)	117	113	107
	R_i (Ohm)	215	217	223
	C_m (pF)	33	32	31
	Pendent (%)	0,40	0,35	0,26

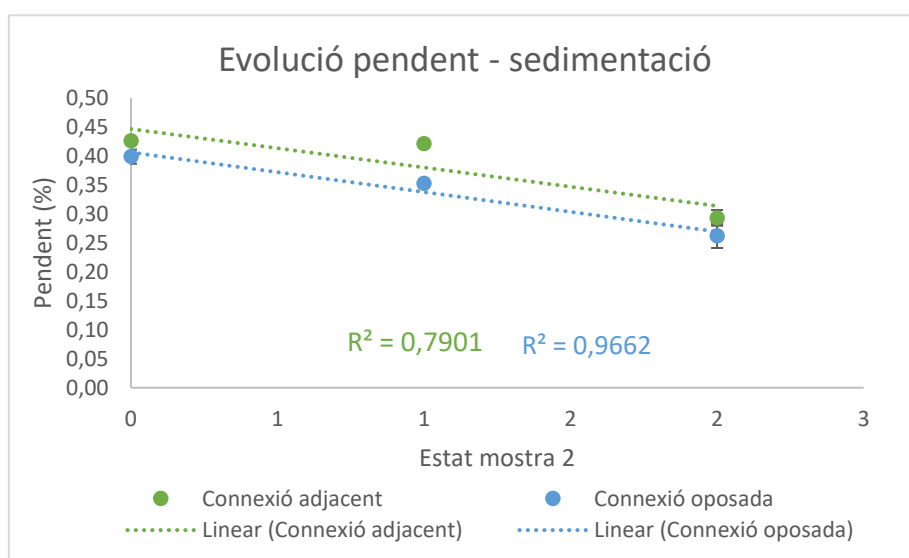


Figura 46: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, i l'estat de la mostra 2

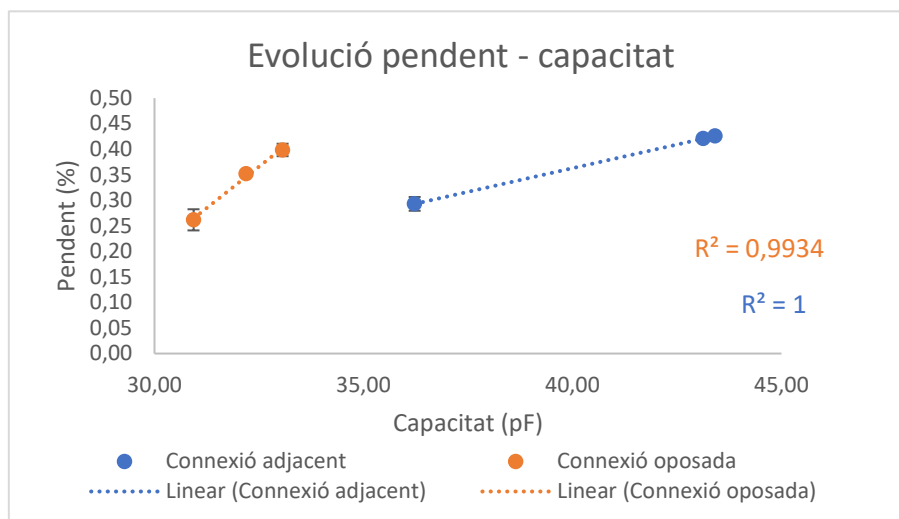


Figura 47: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, i la capacitat de la mostra 2

En la primera gràfica s'observa la evolució del pendent respecte l'estat de la mostra, on 0 és l'estat homogeni, 1 i 2 són els estats respectius de sedimentació. Tant la gràfica pendent-concentració com pendent-capacitat mostren una relació lineal alta.

4.4.1.3. Mostra 3

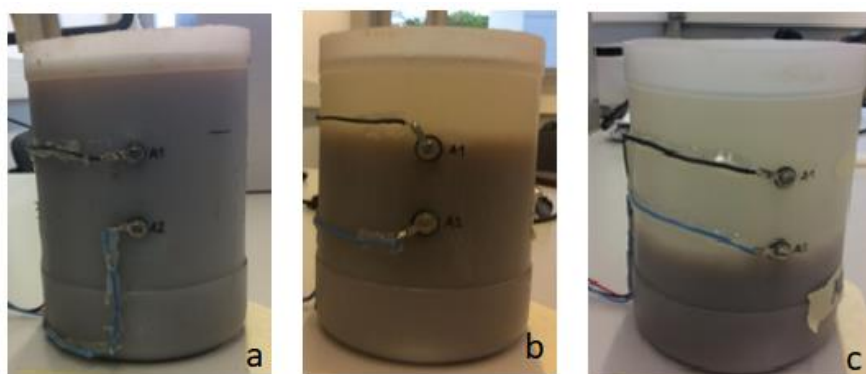


Figura 48: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 3. a) Mostra homògena; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2

Taula 12: : Valors model circuital i pendent, de la mostra 3

		Homogeni	Sediment 1	Sediment 2
Connexió adjacent	R_e (Ohm)	123,5	121,6	119,8
	R_i (Ohm)	175,7	176,9	176,1
	C_m (pF)	40,0	39,4	37,7
	Pendent (%)	0,36	0,34	0,21
Connexió oposada	R_e (Ohm)	111,0	106,5	103,9
	R_i (Ohm)	224,4	226,8	227,9
	C_m (pF)	31,1	29,9	29,0
	Pendent (%)	0,32	0,26	0,18

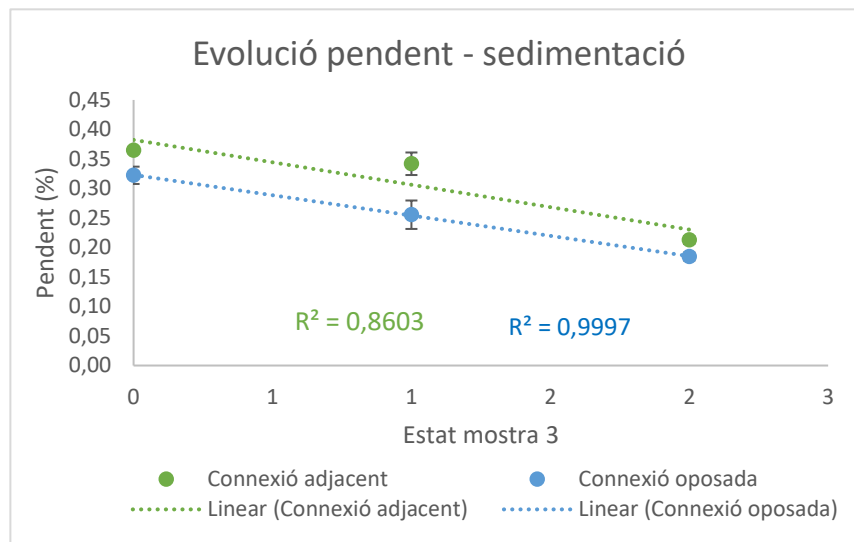


Figura 49: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte sedimentació mostra 3

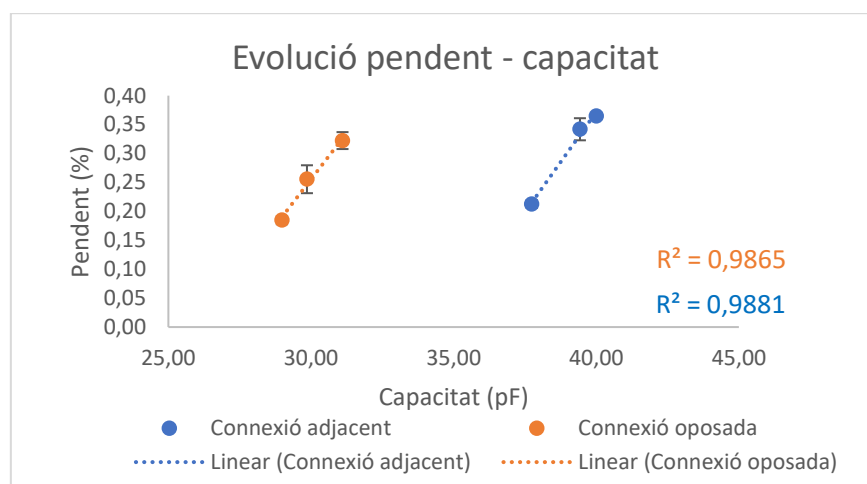


Figura 50: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat mostra 3

La primera gràfica ens mostra la evolució del pendent respecte l'estat de sedimentació, on 0 és l'estat homogeni, 1 i 2 els estats de sedimentació respectius. S'observa una bona relació lineal entre el pendent i la concentració, i el pendent i la capacitat de la membrana.

4.4.2. Mesures amb el pot N

Taula 13: : Valors model circuital i pendent, en configuració d'elèctrodes adjacents

Mostra	SSV (%)	Connexió adjacent				Connexió oposada			
		R_e (Ohm)	R_i (Ohm)	C_m (pF)	Pendent (%)	R_e (Ohm)	R_i (Ohm)	C_m (pF)	Pendent (%)
1	0,46	153	517	15,0	0,7	162	363	21,1	0,5
2	0,49	150	507	14,0	0,6	156	357	19,7	0,3
3	0,31	135	520	13,2	0,5	153	364	19,3	0,3
4	0,15	127	540	12,6	0,4	144	383	18,2	0,2
Clarificat	0	112	573	12,0	0,4	137	403	17,3	0,2

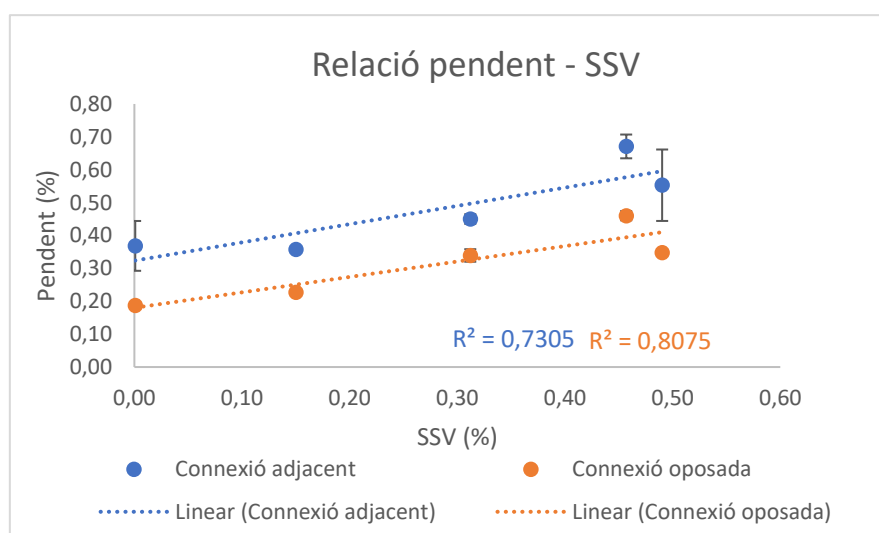


Figura 51: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, i el SSV de les mostres

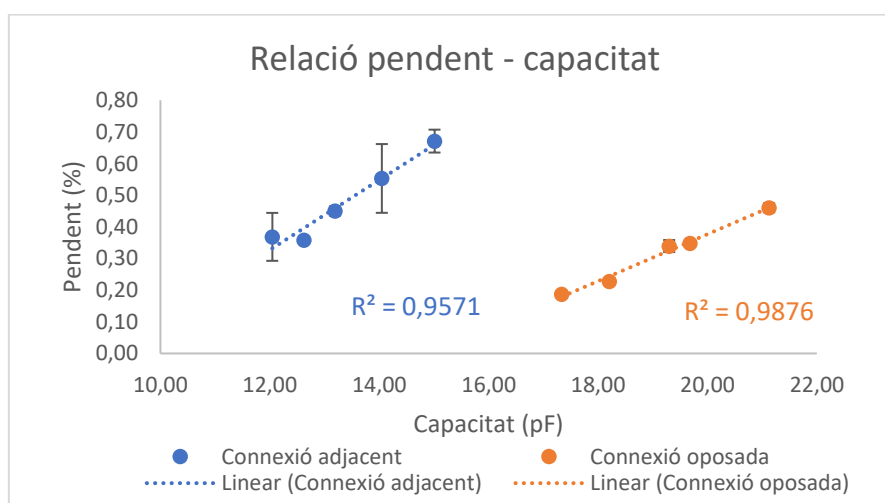


Figura 52: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat mostres

Els resultats de les mesures amb el *pot N*, mostren bones relacions lineals tant respecte pendent i la concentració de SSV com el pendent i la capacitat.

4.5. Mostra fangs activats 23 de maig

La mostra mesurada pertany al reactor biològic de la EDAR de Sant Feliu. Per a aquesta última mostra hem utilitzat el *pot N*, degut a que en el mostratge anterior, del 25 d'abril, s'han obtingut variacions més grans de pendent, per les mateixes mostres, amb el pot N que amb el pot V. Això és degut a que en el pot N s'ha cobert parcialment els elèctrodes per tal de disminuir-la seva àrea fent així augmentar la constant de cel·la (veure equació 1), a l'obtenir una constant de cel·la més gran, la impedància mesurada és més gran, i per tant obtenim canvis més grans (que permetria usar eines més senzilles). En futures línies cal estudiar la manera de fer un recipient de mesura més eficient, que detecti canvis més grans. Totes les mesures d'aquest mostratge van ser realitzades el mateix dia.

Taula 14: Valors model circuital i pendent, en configuració d'elèctrodes adjacents

Mostra	SSV (%)	Connexió adjacent				Connexió oposada			
		R_e (Ohm)	R_i (Ohm)	C_m (pF)	Pendent (%)	R_e (Ohm)	R_i (Ohm)	C_m (pF)	Pendent (%)
1	0,20	677	115	8,83	0,41	527,8	165,6	10,24	0,29
2	0,28	657	117	10,82	0,78	518,6	146,7	12,28	0,61
3	0,29	652	118	10,05	0,57	513,6	160,4	11,11	0,38
4	0,49	649	124	9,58	0,57	510,5	157,0	11,06	0,41
Clarificat	0,00	648	115	9,67	0,34	511,0	150,8	11,03	0,23

A l'annex podem observar una taula amb els valor de conductivitat i temperatura de cada una de les lectures de les mostres.

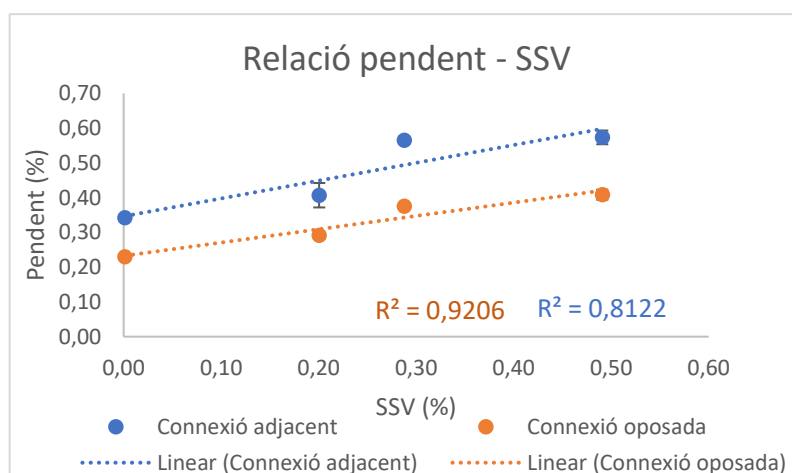


Figura 53: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte SSV mostres

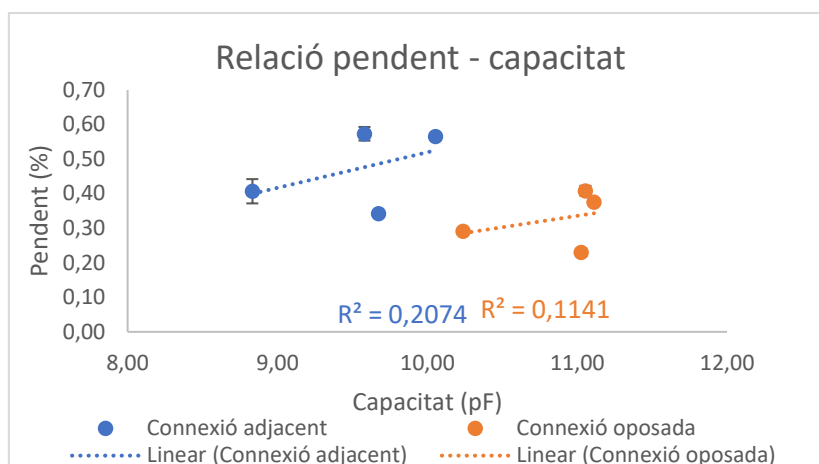


Figura 54: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat mostres

En la primera gràfica s'observen uns valors de coeficients de determinació de 0,8122 i 0,9206, en adjacent i oposat respectivament, mostrant així una alta relació lineal entre el pendent i els SSV. No obstant això, la segona gràfica del pendent respecte la capacitat, no obté una relació lineal, pot ser degut a una mala qualitat de les cèl·lules.

4.5.1. Mostra 1

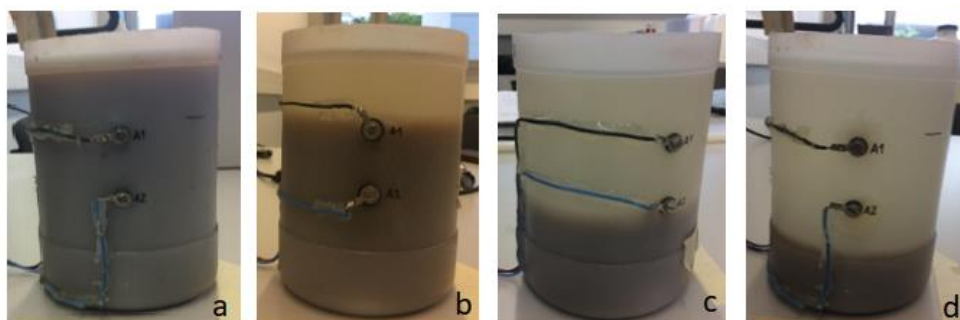


Figura 55: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 1. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2; d) Sedimentació 3

Taula 15: Valors model circuital i pendent

		Homogeni	Sediment 1	Sediment 2	Sediment 3
Connexió adjacent	R_e (Ohm)	677	666	662	661
	R_i (Ohm)	115	109	111	113
	C_m (pF)	8,8	9,4	9,5	9,5
	Pendent (%)	0,41	0,37	0,31	0,35
Connexió oposada	R_e (Ohm)	528	524	522	521
	R_i (Ohm)	166	140	147	144
	C_m (pF)	10,2	11,1	11,0	11,0
	Pendent (%)	0,29	0,24	0,22	0,23

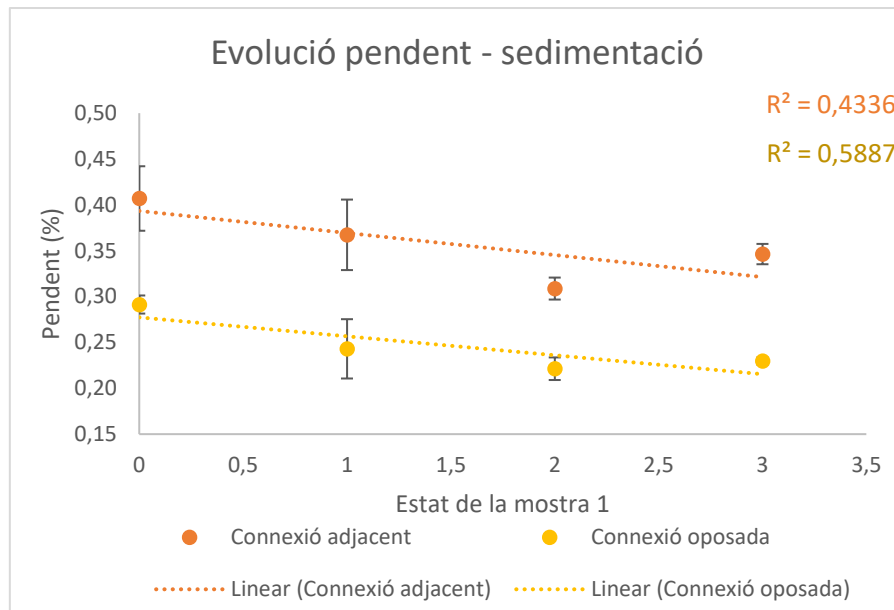


Figura 56: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte estat de la mostra 1

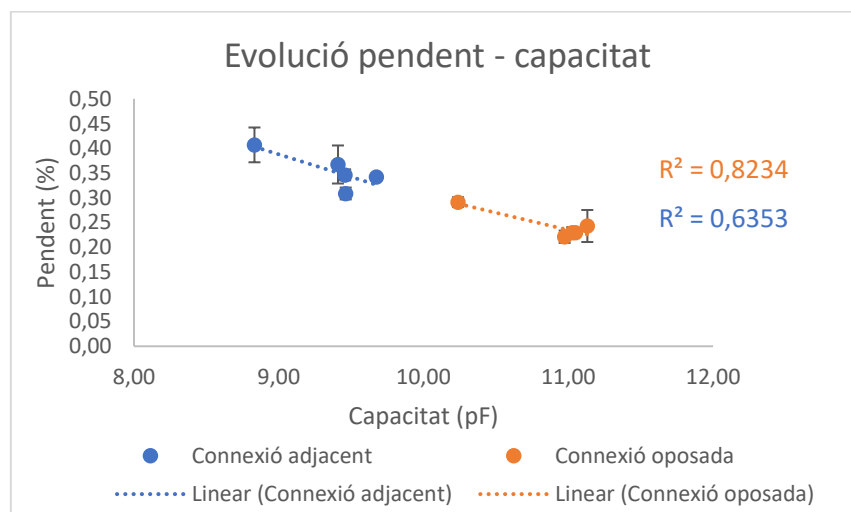


Figura 57: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat mostra 1

En la primera gràfica observem una baixa relació lineal, en canvi en la segona gràfica, on es relaciona la capacitat i el pendent, obtenim valors de coeficient de determinació superiors.

4.5.2. Mostra 2

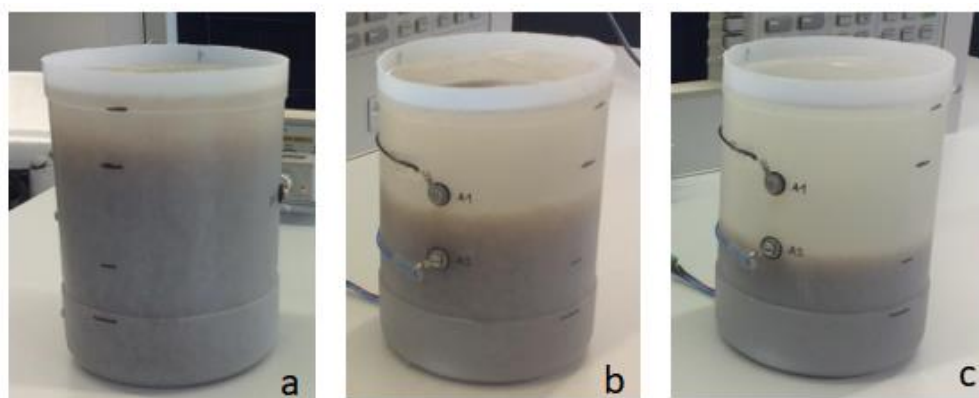


Figura 58: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 2. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2

Taula 16: Valors model circuital i pendent

		Homogeni	Sediment 1	Sediment 2
Connexió adjacent	R_e (Ohm)	657	661	651
	R_i (Ohm)	117	118	118
	C_m (pF)	10,82	10,63	10,18
	Pendent (%)	0,78	0,76	0,53
Connexió oposada	R_e (Ohm)	519	515	512
	R_i (Ohm)	147	150	153
	C_m (pF)	12,28	11,70	11,17
	Pendent (%)	0,61	0,46	0,32

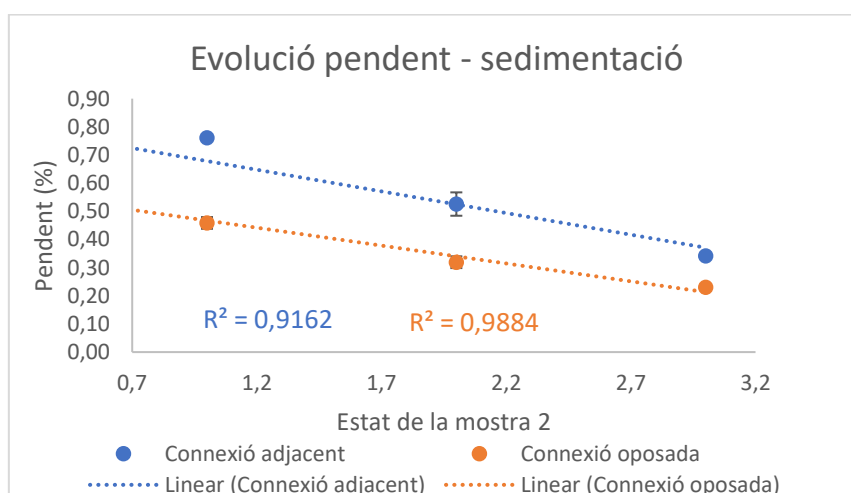


Figura 59: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte l'estat de la mostra 2

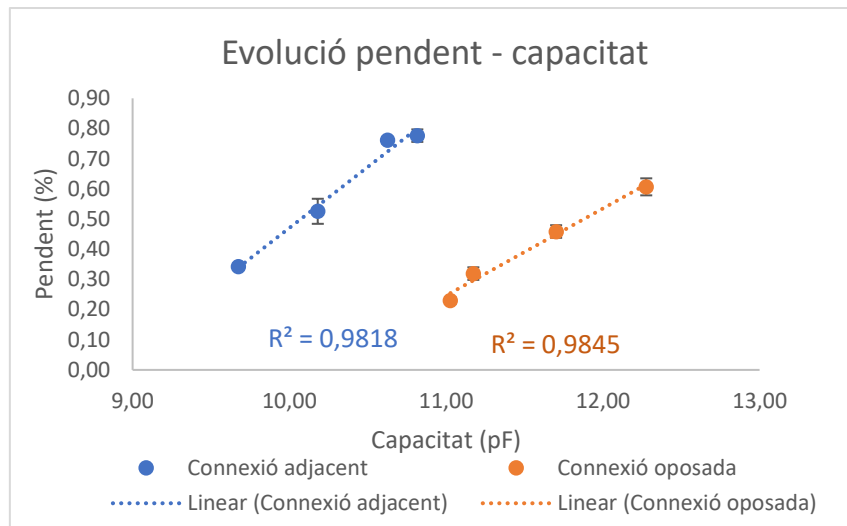


Figura 60: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat mostra 2

La mostra 2 presenta una bona relació lineal tant per la relació pendent- estat de la mostra (Figura 59), on a l'eix de les X 0 és l'estat homogeni, 1, 2 i 3 són els estats de sedimentació respectius, com també mostra bona relació lineal entre el pendent i la capacitat.

4.5.3. Mostra 3

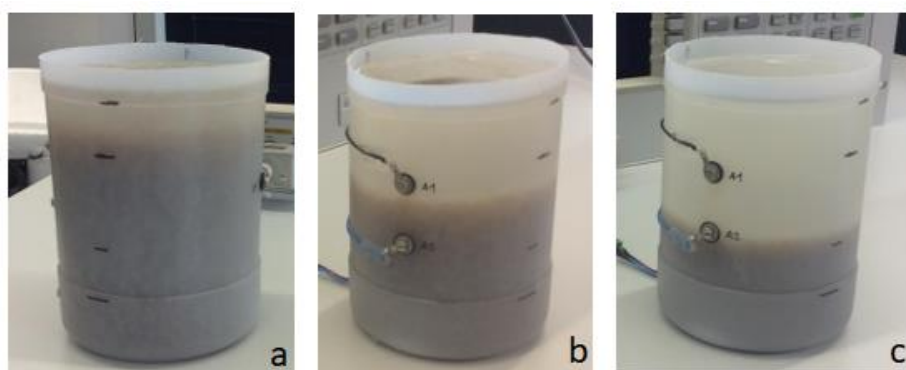


Figura 61: Evolució temporal de la sedimentació de la mostra 3. a) Mostra homogènia; b) Sedimentació 1; c) Sedimentació 2

Taula 17: Valors model circuital i pendent, en configuració d'elèctrodes adjacents

		Homogeni	Sediment 1	Sediment 2
Connexió adjacent	R_e (Ohm)	652,0	651,6	646,8
	R_i (Ohm)	117,7	123,7	117,5
	C_m (pF)	10,05	9,89	9,85
	Pendent (%)	0,57	0,62	0,53
Connexió oposada	R_e (Ohm)	513,6	510,6	507,5
	R_i (Ohm)	160,4	156,9	156,1
	C_m (pF)	11,11	11,09	10,91
	Pendent (%)	0,38	0,32	0,26

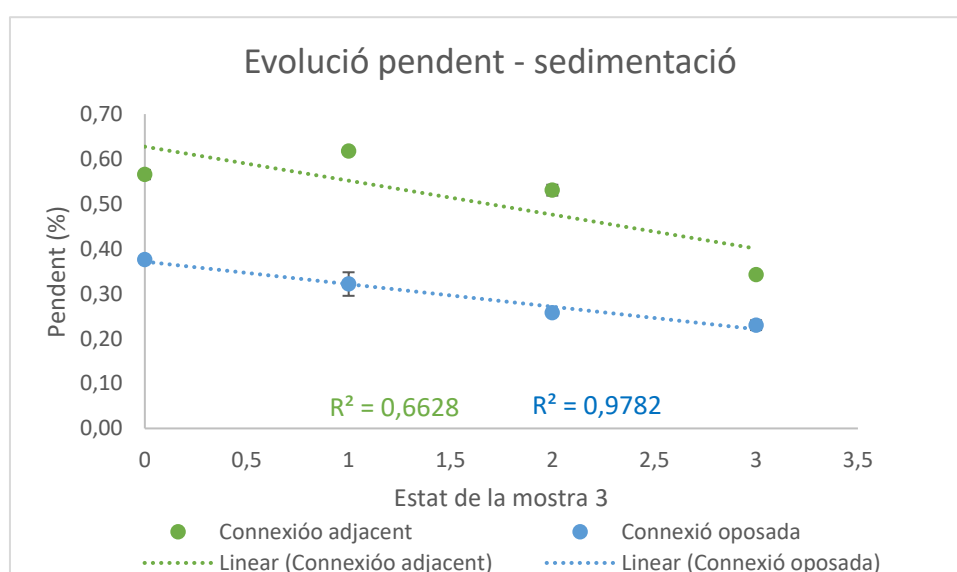


Figura 62: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte l'estat de la mostra 3

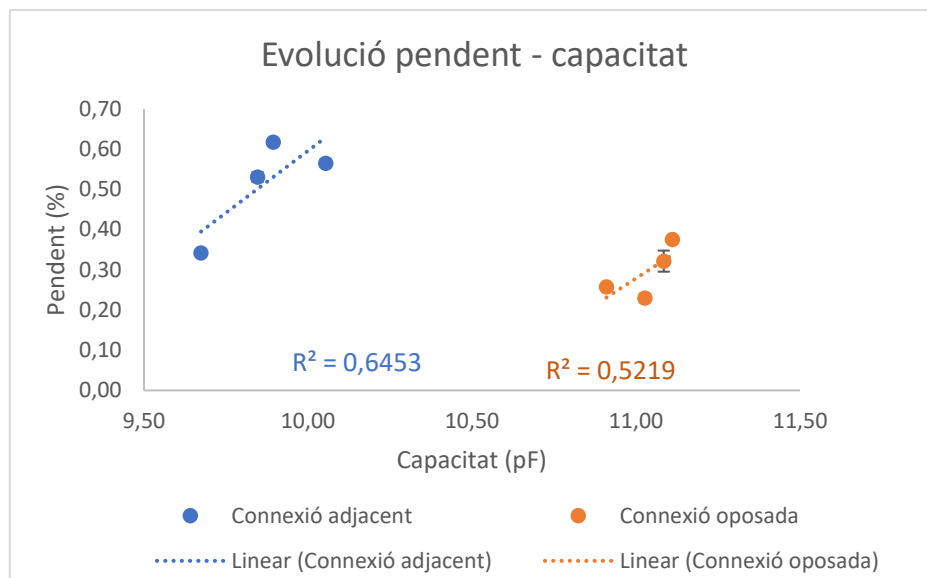


Figura 63: Evolució pendent, amb la seva desviació estàndard, respecte capacitat mostra 3

En la primera gràfica on es relaciona el pendent amb l'estat de sedimentació, on 0 és l'estat homogeni, 1,2 i 3 són els estats de sedimentació respectius. La mostra 3 presenta una forta relació lineal en el cas dels elèctrodes oposats, amb un coeficient de determinació de 0,9782, però en el cas de la configuració d'elèctrodes adjacents té un valor més baix, 0,6628. En la segona gràfica es relaciona el pendent amb la capacitat, obtenint valors de coeficient de determinació que no mostren una alta relació lineal.

4.6. Discussió

En totes les mesures dutes a terme, es pot observar alta relació lineal entre el pendent i els SSV, excepte la de l'apartat 3.5.1 on s'obtenen coeficients de determinació al voltant de 0,4 i 0,5, apart d'aquesta s'obtenen bones relacions lineals pel pendent-SSV. La relació del pendent amb la capacitat, la qual ha estat obtinguda mitjançant l'ajustament de dades, no dona una relació lineal tant bona. Això pot ser degut a que es desconeix la incertesa introduïda al seleccionar les freqüències entre les quals es realitza la mesura, i també per la incertesa degut al algorisme.

Durant aquest estudi s'ha comprovat que hi ha interferències externes que afectarien en la seva possible aplicació en un bioreactor, per exemple, l'agitació magnètica i mecànica no serien possibles durant la mesura degut a que afecten a la lectura de la impedància. En el cas de la temperatura i la conductivitat elèctrica influeixen en el valor de la impedància però no alteren en valor del pendent.

5. Conclusions

Els resultats d'aquest treball han pogut determinar que el pendent d'impedància i la capacitat, tenen una relació directa amb la concentració de biomassa, expressada en SSV. Els canvis en capacitat i pendent són petits, i els resultats amb el pendent són, en general, més bons que els de la capacitat, degut a que depenen directament de la incertesa de l'instrument, que és força bona (0,08 %). En canvi, a l'hora de fer l'ajustament de dades al circuit, es desconeix quina incertesa introdueix la selecció de freqüències i si podria introduir desviacions significatives. Tot i que es coneix que la mesura tetrapolar és més precisa, el pendent d'impedància es pot detectar amb mesures bipolars, permetent una senzilla configuració electrònica.

Al llarg del estudi s'ha demostrat que tant el pendent com la capacitat poden ser utilitzades com a indicador de la concentració de biomassa. Aquesta tècnica de mesura d'EIE podrà aplicar-se en bioreactors per al tractament d'aigües residuals usant el pendent o capacitat com a indicadors, ja que s'ha demostrat que hi ha un canvi en el pendent durant el procés de sedimentació de les mostres. Tot i que encara queden bastants passos fins a poder arribar a l'objectiu de crear un prototip aplicable en un bioreactor, els resultats obtinguts ens permeten pensar que la implementació d'aquesta tècnica per a finalitats d'automatització serà possible i permetria dissenyar bioreactors més eficients i tenir un millor control del procés. El pot N respecte a l'inicial pot V ha mostrat millors resultats en quant a variacions en el pendent, per lo qual ens suggereix que, per tal de millorar la constant de cel·la, s'ha de disminuir l'àrea eficient dels elèctrodes i augmentant la longitud, per a futurs treballs s'haurien d'explorar quin és el millor disseny, de baix cost, per tal d'obtenir canvis més grans en el pendent. En quant a la connexió d'elèctrodes adjacent i oposat, no s'ha vist diferències entre ells en quant a detecció de la concentració, per tant podem concloure que s'obtenen bons resultats per ambdós configuracions.

Es pot concloure que és viable fer una interpretació més simple de la tècnica de l'EIE, per la qual cosa el pendent i la capacitat es poden correlacionar amb la concentració de biomassa, expressada en VSS.

Bibliografia

- [1] August Bonmatí Blasi, "Memoria científico-técnica del proyecto OPRENAC."
- [2] A. Magrí Aloy, "Modelització del tractament biològic de la fracció líquida de purins orientat a l'eliminació de nitrogen," 2007.
- [3] S. Grimnes and Ø. G. Martinsen, *Bioimpedance and bioelectricity basics*. Academic, 2000.
- [4] D. Ehgartner, P. Sagmeister, C. Herwig, and P. Wechselberger, "A novel real-time method to estimate volumetric mass biodensity based on the combination of dielectric spectroscopy and soft-sensors," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 90, no. 2, pp. 262–272, 2015.
- [5] N. Ramírez, A. Regueiro, O. Arias, and R. Contreras, "Electrochemical impedance spectroscopy: An effective tool for a fast microbiological diagnosis," *Biotechn. Appl.*, vol. 26, no. 2, pp. 72–78, 2009.
- [6] Endress+Hauser Management AG, "Conductivity sensors & transmitters for all industries | Endress+Hauser." [Online]. Available: <https://www.endress.com/en/Field-instruments-overview/liquid-analysis-product-overview/conductivity-sensors-transmitters>. [Accessed: 27-Jun-2018].
- [7] R. Bragós, "Contribució a la caracterització de teixits i sistemes biològics mitjançant tècniques d'espectroscòpia d'impedància elèctrica," in *I Jornades de Doctorat*, 1995.
- [8] O. Cantons, "Online Bio-impedance measurement: characterisation and application in Bio-Systems Engineering," 2016.
- [9] G. N. Stewart, "Researches on the Circulation Time and on the Influences which affect it," *J. Physiol.*, vol. 22, no. 3, pp. 159–183, 1897.
- [10] G. N. Stewart, "THE CHARGES PRODUCED BY THE GROWTH OF BACTERIA IN THE MOLECULAR CONCENTRATION AND ELECTRICAL CONDUCTIVITY OF CULTURE MEDIA.," *J. Exp. Med.*, vol. 4, no. 2, pp. 235–43, 1899.
- [11] H. Fricke, "THE ELECTRIC CAPACITY OF SUSPENSIONS WITH SPECIAL REFERENCE TO BLOOD.," *J. Gen. Physiol.*, vol. 9, no. 2, pp. 137–52, 1925.
- [12] H. P. Schwan, "Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions," *Adv. Biol. Med. Phys.*, vol. 5, pp. 147–209, 1957.
- [13] H. PAULY and H. P. SCHWAN, "[Impedance of a suspension of ball-shaped particles with a shell; a model for the dielectric behavior of cell suspensions and protein solutions].," *Zeitschrift für Naturforschung. Tl. B, Chemie, Biochem. Biophys. Biol. und verwandte Gebiete*, vol. 14B, no. 2, pp. 125–31, 1959.
- [14] CADY and P., "Progress in impedance measurements in microbiology," *Mech. Microbiol.*, pp. 199–239, 1978.
- [15] J. C. S. Richards, A. C. Jason, G. Hobbs, D. M. Gibson, and R. H. Christie, "Electronic measurement of bacterial growth," *J. Phys. E.*, vol. 11, no. 6, pp. 560–568, 1978.
- [16] P. CADY, D. HARDY, S. MARTINS, S. W. DUFOUR, and S. J. KRAEGER, "Automated Impedance Measurements for Rapid Screening of Milk Microbial Content," *J. Food Prot.*, vol. 41, no. 4, pp. 277–283, 1978.
- [17] S. GNAN and L. O. LUEDECKE, "Impedance Measurements in Raw Milk as an Alternative to the Standard Plate Count," *J. Food Prot.*, vol. 45, no. 1, pp. 4–7, 1982.
- [18] D. Hardy, S. J. Kraeger, S. W. Dufour, and P. Cady, "Rapid detection of microbial contamination in frozen vegetables by automated impedance measurements," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 34, no. 1, pp. 14–7, 1977.
- [19] K. M. Sorrells, "Rapid Detection of Bacterial Content in Cereal Grain Products by Automated

- Impedance Measurements," *J. of Food Prot.*, vol. 44, no. 11, pp. 832–834, 1981.
- [20] S. B. Martins and M. J. Selby, "Evaluation of a rapid method for the quantitative estimation of coliforms in meat by impedimetric procedures," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 39, no. 3, pp. 518–24, 1980.
 - [21] M. C. Easter and D. M. Gibson, "Rapid and automated detection of salmonella by electrical measurements," *J. Hyg. (Lond.)*, vol. 94, no. 03, pp. 245–262, 1985.
 - [22] I. M. Gould, A. C. Jason, and K. Milne, "Use of the Malthus Microbial Growth Analyser to study the post antibiotic effect of antibiotics," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 24, no. 4, pp. 523–531, 1989.
 - [23] P. A. Vanrolleghem and D. S. Lee, "On-line monitoring equipment for wastewater treatment processes: state of the art," *Water Sci. Technol.*, vol. 47, no. 2, 2003.
 - [24] E. Dieudé-Fauvel *et al.*, "Modelling the rheological properties of sludge during anaerobic digestion in a batch reactor by using electrical measurements," *Water Res.*, vol. 51, pp. 104–112, 2014.
 - [25] K. F. Lei, "Review on impedance detection of cellular responses in micro/nano environment," *Micromachines*, vol. 5, no. 1, pp. 1–12, 2014.
 - [26] S. Goh and R. J. Ram, "Impedance Spectroscopy for In Situ Biomass Measurements in Microbioreactors," *14th International Conf. Miniaturized Syst. Chem. Life Sci.*, pp. 1556–1558, 2010.
 - [27] M. Dabros *et al.*, "Cole–Cole, linear and multivariate modeling of capacitance data for on-line monitoring of biomass," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 32, no. 2, pp. 161–173, 2009.
 - [28] AMB, "EDAR de Sant Feliu de Llobregat - Àrea metropolitana de Barcelona." [Online]. Available: <http://www.amb.cat/web/medi-ambient/aigua/instalacions-i-equipaments/detall/-/equipament/edar-de-sant-feliu-de-llobregat/274395/11818>. [Accessed: 09-May-2018].
 - [29] C. Aliau Bonet, "Mesura de la conductivitat de l'aigua amb elèctrodes capacitius," *TDX (Tesis Dr. en Xarxa)*, 2015.
 - [30] Laura Tey, "Determinació de Sòlids Suspesos Totals i Sòlids Suspesos Volàtils." IT-3006-L-002, IRTA.
 - [31] American Public Health Association., American Water Works Association., Water Pollution Control Federation., and Water Environment Federation., *Standard methods for the examination of water and wastewater : including bottom sediments and sludges*. American Public Health Association, 1985.
 - [32] J.-L. Dellis, "Zfit - File Exchange - MATLAB Central," 2010. [Online]. Available: <https://es.mathworks.com/matlabcentral/fileexchange/19460-zfit>. [Accessed: 26-Jun-2018].

Annex

Mostra fangs actius 19 de març

Mostra	Repetició	Estat	Elèctrodes	Temperatura (°C)	Conductivitat (mS/cm)	SSV (%)
1	1	Homogeni	Adjacents	18,5	2,060	0,253
1	2	Homogeni	Adjacents	18,5	2,050	0,253
1	3	Homogeni	Adjacents	18,6	2,050	0,253
1	1	Homogeni	Oposats	18,5	2,060	0,253
1	2	Homogeni	Oposats	18,5	2,050	0,253
1	3	Homogeni	Oposats	18,6	2,050	0,253
2	1	Homogeni	Adjacents	18,6	2,040	0,324
2	2	Homogeni	Adjacents	18,4	2,040	0,324
2	3	Homogeni	Adjacents	18,5	2,050	0,324
2	1	Homogeni	Oposats	18,6	2,040	0,324
2	2	Homogeni	Oposats	18,4	2,040	0,324
2	3	Homogeni	Oposats	18,5	2,050	0,324
2	1	Sediment 1	Adjacents	19,0	2,090	0,324
2	1	Sediment 1	Oposats	19,0	2,090	0,324
Clarificat	1	Homogeni	Adjacents	19,3	2,070	0,012
Clarificat	2	Homogeni	Adjacents	19,4	2,070	0,012
Clarificat	3	Homogeni	Adjacents	19,4	2,070	0,012
Clarificat	1	Homogeni	Oposats	19,3	2,070	0,012
Clarificat	2	Homogeni	Oposats	19,4	2,070	0,012
Clarificat	3	Homogeni	Oposats	19,4	2,070	0,012
2	1	Sediment 2	Adjacents	19,4	2,130	0,324
2	1	Sediment 2	Oposats	19,4	2,130	0,324
3	1	Homogeni	Adjacents	19,3	2,060	0,098
3	1	Homogeni	Oposats	19,3	2,060	0,098
1	1	Sediment 1	Adjacents	19,3	2,070	0,253
1	1	Sediment 1	Oposats	19,3	2,070	0,253
2	1	Sediment 3	Adjacents	20,0	2,100	0,324
2	1	Sediment 3	Oposats	20,0	2,100	0,324
1	1	Sediment 2	Adjacents	19,8	2,080	0,253

1	1	Sediment 2	Oposats	19,8	2,080	0,253
4	1	Homogeni	Adjacents	17,0	1,327	0,492
4	2	Homogeni	Adjacents	17,1	1,332	0,492
4	3	Homogeni	Adjacents	17,4	1,336	0,492
4	1	Homogeni	Oposats	17,0	1,237	0,492
4	2	Homogeni	Oposats	17,1	1,332	0,492
4	3	Homogeni	Oposats	17,4	1,336	0,492
4	1	Sediment 1	Adjacents	18,0	1,340	0,492
4	1	Sediment 1	Oposats	18,0	1,340	0,492
4	1	Sediment 2	Adjacents	18,9	1,349	0,492
4	1	Sediment 2	Oposats	18,9	1,349	0,492

Mostra fangs actius 25 d'abril pot V

Mostra	Repetició	Estat	Electròdes	Temperatura (°C)	Conductivitat (mS/cm)	SSV (%)
1	1	Homogeni	adj	21,2	2,14	0,46
1	2	Homogeni	adj	21,2	2,14	0,46
1	3	Homogeni	adj	21,2	2,14	0,46
1	1	Homogeni	opo	21,1	2,14	0,46
1	2	Homogeni	opo	21,1	2,14	0,46
1	3	Homogeni	opo	21,1	2,14	0,46
1	1	Sediment 1	adj	21,2	2,18	0,46
1	2	Sediment 1	adj	21,2	2,18	0,46
1	3	Sediment 1	adj	21,2	2,18	0,46
1	1	Sediment 1	opo	21,1	2,18	0,46
1	2	Sediment 1	opo	21,1	2,18	0,46
1	3	Sediment 1	opo	21,1	2,18	0,46
1	1	Sediment 2	adj	21,6	2,20	0,46
1	2	Sediment 2	adj	21,6	2,20	0,46
1	3	Sediment 2	adj	21,6	2,20	0,46
1	1	Sediment 2	opo	21,6	2,20	0,46
1	2	Sediment 2	opo	21,6	2,20	0,46
1	3	Sediment 2	opo	21,6	2,20	0,46

2	1	Homo	adj	21,6	2,14	0,49
2	2	Homo	adj	21,6	2,14	0,49
2	3	Homo	adj	21,6	2,14	0,49
2	1	Homo	opo	21,6	2,14	0,49
2	2	Homo	opo	21,6	2,14	0,49
2	3	Homo	opo	21,6	2,14	0,49
2	1	Sediment 1	adj	21,4	2,17	0,49
2	2	Sediment 1	adj	21,4	2,17	0,49
2	3	Sediment 1	adj	21,4	2,17	0,49
2	1	Sediment 1	opo	21,4	2,17	0,49
2	2	Sediment 1	opo	21,4	2,17	0,49
2	3	Sediment 1	opo	21,4	2,17	0,49
2	1	Sediment 2	adj	18,6	2,30	0,49
2	2	Sediment 2	adj	18,6	2,30	0,49
2	3	Sediment 2	adj	18,6	2,30	0,49
2	1	Sediment 2	opo	18,6	2,30	0,49
2	2	Sediment 2	opo	18,6	2,30	0,49
2	3	Sediment 2	opo	18,6	2,30	0,49
3	1	Homo	adj	21,6	2,14	0,31
3	2	Homo	adj	21,6	2,14	0,31
3	3	Homo	adj	21,6	2,14	0,31
3	1	Homo	opo	21,6	2,14	0,31
3	2	Homo	opo	21,6	2,14	0,31
3	3	Homo	opo	21,6	2,14	0,31
3	1	Sediment 1	adj	21,7	2,14	0,31
3	2	Sediment 1	adj	21,7	2,14	0,31
3	3	Sediment 1	adj	21,7	2,14	0,31
3	1	Sediment 1	opo	21,7	2,14	0,31
3	2	Sediment 1	opo	21,7	2,14	0,31
3	3	Sediment 1	opo	21,7	2,14	0,31
3	1	Sediment 2	adj	21,5	2,18	0,31
3	2	Sediment 2	adj	21,5	2,18	0,31
3	3	Sediment 2	adj	21,5	2,18	0,31

3	1	Sediment 2	opo	21,5	2,18	0,31
3	2	Sediment 2	opo	21,5	2,18	0,31
3	3	Sediment 2	opo	21,5	2,18	0,31
4	1	Homo	adj	19,0	2,25	0,15
4	2	Homo	adj	19,0	2,25	0,15
4	3	Homo	adj	19,0	2,25	0,15
4	1	Homo	opo	19,0	2,25	0,15
4	2	Homo	opo	19,0	2,25	0,15
4	3	Homo	opo	19,0	2,25	0,15
Clarificat	1	Homo	adj	18,9	2,19	0,00
Clarificat	2	Homo	adj	18,9	2,19	0,00
Clarificat	3	Homo	adj	18,9	2,19	0,00
Clarificat	1	Homo	opo	18,9	2,19	0,00
Clarificat	2	Homo	opo	18,9	2,19	0,00
Clarificat	3	Homo	opo	18,9	2,19	0,00

Mostra fangs actius 25 d'abril pot N

Mostra	Repetició	Estat	Electròdes	Temperatura (°C)	Conductivitat (mS/cm)	SSV (%)
1	1	Homo	adj	21,5	2,13	0,46
1	2	Homo	adj	21,2	2,13	0,46
1	3	Homo	adj	21,1	2,13	0,46
1	1	Homo	opo	21,1	2,13	0,46
1	2	Homo	opo	21,2	2,13	0,46
1	3	Homo	opo	21,1	2,13	0,46
2	1	Homo	adj	21,3	2,12	0,49
2	2	Homo	adj	21,3	2,12	0,49
2	3	Homo	adj	21,3	2,12	0,49
2	1	Homo	opo	21,1	2,13	0,49
2	2	Homo	opo	21,1	2,13	0,49

2	3	Homo	opo	21,1	2,13	0,49
3	1	Homo	adj	21,4	2,15	0,31
3	2	Homo	adj	21,4	2,15	0,31
3	3	Homo	adj	21,4	2,15	0,31
3	1	Homo	opo	21,4	2,15	0,31
3	2	Homo	opo	21,4	2,15	0,31
3	3	Homo	opo	21,4	2,15	0,31
4	1	Homo	adj	19,1	2,24	0,15
4	1	Homo	opo	19,1	2,24	0,15
Clarificat	1	Homo	adj	18,7	2,20	0,00
Clarificat	2	Homo	adj	18,7	2,20	0,00
Clarificat	3	Homo	adj	18,7	2,20	0,00
Clarificat	1	Homo	opo	18,7	2,20	0,00
Clarificat	2	Homo	opo	18,7	2,20	0,00
Clarificat	3	Homo	opo	18,7	2,20	0,00

Mostra fangs actius 23 de maig

Mostra	Repetició	Estat	Electròdes	Temperatura (°C)	Conductivitat (mS/cm)	SSV (%)
1	1	Homo	adj	22,2	2,08	0,20
1	2	Homo	adj	22,2	2,08	0,20
1	3	Homo	adj	22,2	2,08	0,20
1	1	Homo	opo	22,2	2,08	0,20
1	2	Homo	opo	22,2	2,08	0,20
1	3	Homo	opo	22,2	2,08	0,20
1	1	Sed 1	adj	22,0	2,11	0,20
1	2	Sed 1	adj	22,0	2,11	0,20
1	3	Sed 1	adj	22,0	2,11	0,20
1	1	Sed 1	opo	22,0	2,11	0,20
1	2	Sed 1	opo	22,0	2,11	0,20

1	3	Sed 1	opo	22,0	2,11	0,20
1	1	Sed 2	adj	22,1	2,12	0,20
1	2	Sed 2	adj	22,1	2,12	0,20
1	3	Sed 2	adj	22,1	2,12	0,20
1	1	Sed 2	opo	22,1	2,12	0,20
1	2	Sed 2	opo	22,1	2,12	0,20
1	3	Sed 2	opo	22,1	2,12	0,20
1	1	Sed 3	adj	22,1	2,12	0,20
1	2	Sed 3	adj	22,1	2,12	0,20
1	3	Sed 3	adj	22,1	2,12	0,20
1	1	Sed 3	opo	22,1	2,12	0,20
1	2	Sed 3	opo	22,1	2,12	0,20
1	3	Sed 3	opo	22,1	2,12	0,20
2	1	Homo	adj	22,6	2,09	0,28
2	2	Homo	adj	22,6	2,09	0,28
2	3	Homo	adj	22,6	2,09	0,28
2	1	Homo	opo	22,6	2,09	0,28
2	2	Homo	opo	22,6	2,09	0,28
2	3	Homo	opo	22,6	2,09	0,28
2	1	Sed 1	adj	22,6	2,12	0,28
2	2	Sed 1	adj	22,6	2,12	0,28
2	3	Sed 1	adj	22,6	2,12	0,28
2	1	Sed 1	opo	22,6	2,12	0,28
2	2	Sed 1	opo	22,6	2,12	0,28
2	3	Sed 1	opo	22,6	2,12	0,28
2	1	Sed 2	adj	22,8	2,13	0,28
2	2	Sed 2	adj	22,8	2,13	0,28
2	3	Sed 2	adj	22,8	2,13	0,28
2	1	Sed 2	opo	22,8	2,13	0,28
2	2	Sed 2	opo	22,8	2,13	0,28
2	3	Sed 2	opo	22,8	2,13	0,28
3	1	Homo	adj	22,7	2,09	0,29
3	2	Homo	adj	22,7	2,09	0,29

3	3	Homo	adj	22,7	2,09	0,29
3	1	Homo	opo	22,7	2,09	0,29
3	2	Homo	opo	22,7	2,09	0,29
3	3	Homo	opo	22,7	2,09	0,29
3	1	Sed 1	adj	22,9	2,12	0,29
3	2	Sed 1	adj	22,9	2,12	0,29
3	3	Sed 1	adj	22,9	2,12	0,29
3	1	Sed 1	opo	22,9	2,12	0,29
3	2	Sed 1	opo	22,9	2,12	0,29
3	3	Sed 1	opo	22,9	2,12	0,29
3	1	Sed 2	adj	23,1	2,15	0,29
3	2	Sed 2	adj	23,1	2,15	0,29
3	3	Sed 2	adj	23,1	2,15	0,29
3	1	Sed 2	opo	23,1	2,15	0,29
3	2	Sed 2	opo	23,1	2,15	0,29
3	3	Sed 2	opo	23,1	2,15	0,29
4	1	Homo	adj	22,8	2,10	0,49
4	2	Homo	adj	22,8	2,10	0,49
4	3	Homo	adj	22,8	2,10	0,49
4	1	Homo	opo	22,8	2,10	0,49
4	2	Homo	opo	22,8	2,10	0,49
4	3	Homo	opo	22,8	2,10	0,49
Clarificat	1	Homo	adj	22,9	2,12	0,00
Clarificat	2	Homo	adj	22,9	2,12	0,00
Clarificat	3	Homo	adj	22,9	2,12	0,00
Clarificat	1	Homo	opo	22,9	2,12	0,00
Clarificat	2	Homo	opo	22,9	2,12	0,00
Clarificat	3	Homo	opo	22,9	2,12	0,00